

明 細 書

形質転換細胞および該細胞を用いたタンパク質の生産方法並びにタンパク質生産キット、ウイルスベクター発現用DNA断片およびその利用、タンパク質生産用形質転換体の生産方法および当該生産方法によって得られたタンパク質生産用形質転換体並びにその利用

技術分野

- [0001] 本発明は、発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含み、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、転写誘導可能なプロモーター(例えば、ホルモン等の化学物質にて誘導されるプロモーター等)とを連結してなる発現ベクターが導入されていることを特徴とする形質転換細胞、および該形質転換細胞を用いたタンパク質の生産方法、並びに該タンパク質の生産方法を行うためのキットに関するものである。
- [0002] より具体的には、発現させようとするタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)に対するサプレッサーを有するトマトモザイクウイルス(以下適宜ToMVと略す)の遺伝子と、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結してなる発現ベクターを、アグロバクテリウム法により導入されてなる形質転換タバコBY-2細胞、および該形質転換タバコBY-2細胞を用いたタンパク質の生産方法、並びに該タンパク質の生産方法を行うためのキットに関するものである。
- [0003] また、本発明は、ウイルスベクター発現用DNA断片およびその利用に関するものである。
- [0004] より具体的には、任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAの3'末端にリボザイム配列を結合したDNA断片、当該DNA断片を含むベクター、および上記DNA断片またはベクターを用いて得られる形質転換体に関するものである。
- [0005] さらに、本発明は、タンパク質生産に用いる形質転換体であって、任意のタンパク質をコードする遺伝子が挿入されたウイルスベクターを誘導発現する形質転換体を

高確率に生産する方法、および当該生産方法によって生産されたタンパク質生産用形質転換体、並びにその利用の一例に関するものである。

- [0006] より具体的には、転写因子発現用DNA断片を導入する第一形質転換工程と、前記工程によって得られた形質転換体の中から転写因子を発現する形質転換体を選抜する選抜工程と、タンパク質発現用DNA断片を前記選抜工程によって得られた形質転換体に導入する第二形質転換工程とからなるタンパク質生産用形質転換体の生産方法、および当該生産方法によって生産されたタンパク質生産用形質転換体、並びに上記タンパク質生産用形質転換体を用いたタンパク質の生産方法に関するものである。

背景技術

- [0007] 近年、医薬品をはじめとする有用タンパク質の効率的生産方法の開発が注目されている。特に植物を食糧のみならず、医薬品をはじめとする有用タンパク質の生産工場として利用することを目指し、開発が進められている。このような試みは、「分子農業」と呼ばれ次世代農業として期待されている。
- [0008] 現在植物における有用タンパク質の生産は、形質転換植物を用いる方法(例えば非特許文献5(Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals Glynis Giddings, Gordon Allison, Douglas Brooks & Adrian Carter Nature Biotechnology (2000) 18: 1151 - 1155.)参照)と、ウイルスベクターを植物に感染させる方法のいずれかで行われている(例えば、非特許文献1;石川県農業短期大学付属農業資源研究所平成12年度年報、No. 9, 2000, p. 16-18(発行日:平成13年10月25日)および非特許文献2;石川県農業短期大学付属農業資源研究所平成13年度年報、No. 10, 2001, p. 13-16(発行日:平成14年9月25日)並びに非特許文献9;Pogue GP, Lindbo JA, Gargner SJ, Fitzmaurice WP Making an ally from an enemy: Plant virology and the new agriculture. Annu Rev Phytopathol. 2002, 40: 45-74.参照)。
- [0009] 本発明者らは、これまでに植物ウイルス(ブロムモザイクウイルス)の複製酵素遺伝子と、これにより増幅される有用タンパク質遺伝子とともに植物の染色体内に組み込むことができ、複製酵素遺伝子の発現を制御することにより、有用タンパク質を合成することができる遺伝子発現系(以下高効率mRNA誘導増幅系と称する)を構築し

た。当該高効率mRNA誘導増幅系を、ニコチアナベンサミアーナ植物に適用し、複製酵素のサブユニットの一つである1aタンパク質をステロイドホルモン制御系で誘導発現することによって、ガンマイインターフェロン遺伝子をRNAレベルで増幅することが可能となった(上記非特許文献1および2参照)。

[0010] さらに本発明者らは、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)に対するサプレッサーを持ち、かつ複製能力の高い一本鎖RNAウイルスであるトバモモザイクウイルス属であるトマトモザイクウイルス(ToMV)をベクターとし、ステロイドホルモンによる誘導によって、高効率に外来タンパク質のmRNAを増幅する系の構築を行った。当該系をニコチアナベンサミアーナ植物に適用し、Green Fluorescent Protein 遺伝子(以下GFP遺伝子と称す)をレポーター遺伝子として、ステロイドホルモン制御系で誘導発現を試みた結果、該遺伝子のRNAレベルでの増幅、およびGFPの発現が確認できた(上記非特許文献2参照)。

[0011] 一方、植物由来培養細胞を用いた有用タンパク質生産も試みられている。例えば、非特許文献3;Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R. "Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells." *Plant Mol boil.* 1995 Mar; 27(6): 1163-72.)においては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを用いたタバコBY-2細胞における組み換えタンパク質の生産が報告されている。また、非特許文献4;Takamatsu N, Watanabe Y, Yanagi H, Meshi T, Shiba T, Okada Y. "Production of enkephalin in tobacco protoplasts using tobacco mosaic virus RNA vector." *FEBS Lett.* 1990 Aug 20; 269(1): 73-6.)においては、タバコモザイクウイルス(以下TMVと称す)の外被タンパク質遺伝子の3'末端に目的とするペプチド遺伝子を連結した変異型ウイルスRNAベクターを用いて、プロトプラスト化したタバコBY-2細胞に接種させ、外被タンパク質との融合タンパク質を発現させている。

[0012] 前記植物におけるタンパク質の生産方法のうち、形質転換植物を用いる方法では、植物を栽培するのみでタンパク質の生産が可能であるが、1細胞あたりの生産効率は著しく低いという問題点がある。一方ウイルスベクターを植物に感染させる方法は、高い生産効率を有するが、接種作業が必要なため作業効率が悪いこと、およびウイ

- ” ルスの外界への飛散等の安全性の問題により大規模生産化が困難となっている。
- [0013] また前述の本発明者が構築したブロムモザイクウイルスを用いた高効率mRNA誘導増幅系の場合は、ブロムモザイクウイルスにウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)に対するサプレッサーが存在しないため、粒子化できない組み換えウイルスを用いた場合は、サイレンシング反応(ウイルス抵抗性反応)によりウイルスRNAが分解されてしまう。つまり、ブロムモザイクウイルスを用いた高効率mRNA誘導増幅系には、当該目的タンパク質をコードする遺伝子はRNAレベルで増幅するものの、時間の経過とともに該RNAがウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)によって分解されてしまい、継続的なタンパク質の高生産が行えないという欠点がある。さらに当該系においては、ステロイドホルモンで活性化された転写因子が、植物の黄化等を引き起こし植物の生長に悪影響を及ぼすという欠点も有している。
- [0014] 一方、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)に対するサプレッサーを有するToMVを用いた系によって、植物個体内でタンパク質を生産する場合は、サイレンシングによるRNAの分解は回避でき高効率にタンパク質を生産することが可能であったが、植物の栽培設備等が必要でありスケールアップが困難であること、植物の生産には比較的長期間を要すること、形質転換植物個体の種子や花粉等の飛散による安全性に対する問題、操作が煩雑であること等、様々な欠点を有している。
- [0015] その他、上記非特許文献3および4に挙げたタバコBY-2細胞を用いたタンパク質生産系は、培地における細胞培養によってタンパク質を生産することができ、スケールアップは容易であり、また増殖速度が高いために時間的メリットが大きい。さらに培養細胞であるため、例え外界に漏洩した場合であってもすぐに死滅してしまうために安全性の面においても優れている。しかしながら、これらの方法においても、生産効率が低い、操作が煩雑である(プロトプラスト化、接種操作)等の問題点を有している。
- [0016] また、本発明者らは、大規模生産能力、高い生産効率および安全性を併せ持つ新しいタンパク質合成系(高効率mRNA誘導増幅系)を既に開発している。この高効率mRNA誘導増幅系の特徴は、ウイルスの複製酵素遺伝子と、それにより増幅される有用タンパク質遺伝子とを、共に植物の染色体に組み込むことであり、さらに、その組み換え植物での複製酵素の発現を制御することにより、有用タンパク質の合成を

- " 制御する点である(非特許文献6;Mori, M., Fujihara, N., Mise, K. and Furusawa, I. (2001) Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants. *Plant J* 27(1), 79-86.)参照)。
- [0017] さらに、本発明者らは、植物のサイレンシング反応に対するサプレッサーを持つウイルスを利用することにより、上記高効率mRNA誘導増幅系の改良を行っている(上記非特許文献2参照)。
- [0018] 一方、発明者らはリボザイム配列をウイルスcDNAの3'末端に組み込み、タバコ植物体で形質転換体を作製し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターによって転写させた結果、リボザイムなしの場合に比べウイルスRNA増殖が増加したことを報告している(非特許文献7;Kaido, M., Mori, M., Mise, K., Okuno, T. and Furusawa, I. (1997) Auto-cleavable ribozyme sequence attached to brome mosaic virus cDNAs enhances accumulation of viral RNAs transcribed in vivo from the cDNAs. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63, 95-98.)。また、タバコ植物において、リボザイム配列を3'末端に付加したタバコモザイクウイルスcDNAを、アグロバクテリウムを用いた方法でトランスフェクションしたところ、感染効率が2倍程度に増加したことが報告されている(非特許文献8;Turpen, T.H., Turpen, A.M., Weinzettl, N., Kumagai, M.H. and Dawson W.O. (1993) Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. *J. Virol. Methods.* 42(2-3), 227-239.)。
- [0019] 植物に有用な任意のタンパク質を生産させるため、上記改良した高効率mRNA誘導増幅系を用いてタバコ培養細胞であるBY2細胞を形質転換したところ、ウイルスが増幅された細胞は最高5%であった。多くの細胞でウイルスの増幅が認められなかった一因としては、細胞内でcDNAから転写されるウイルスRNAの3'末端にターミネーター由来の配列とポリA配列が付加されていることが考えられた。したがって、当該高効率mRNA誘導増幅系をさらに改良し、細胞内でcDNAから転写されるウイルスRNAの3'末端に付加されている余分な配列を取り除く工夫が必要である。
- [0020] 上記細胞内でcDNAから転写されるウイルスRNAの3'末端に付加されている余分な配列を取り除く工夫の一例として、前述の非特許文献7および8に記載されてい

るリボザイムの利用が考えられる。しかし、非特許文献7は単にウイルスRNAの増殖に関してリボザイムの有無による効果の違いを検討したものであり、外来タンパク質の発現を目的としたものではなく、転写誘導プロモーターを用いたものでもない。また、非特許文献8は、形質転換体を作製したものではなく、アグロバクテリウムを用いたcDNAからの一過性の感染の結果である。この報告の結果はリボザイム付加による感染効率の増加は2倍程度に留まっており、その後現在までタバコモザイクウイルスの属するトバモウイルス属のウイルスベクターにおいてはリボザイム配列の効果は限定的であり、トバモウイルスベクターにタンパク質を生産させる目的でリボザイム配列を付加することは有効でないと考えられていた。

[0021] また、上述したように、本発明者らは、植物のサイレンシング反応に対するサプレッサーを持つウイルスを利用することにより、上記高効率mRNA誘導増幅系のmRNAの増幅効率を向上させることに成功した(上記非特許文献2および非特許文献10; 石川県農業短期大学附属農業資源研究所平成14年度年報 No.11 2002、p.14-15。(発行日:平成15年12月26日)参照)。

[0022] また本発明者らは、上記高効率mRNA誘導増幅系において、ウイルスcDNAの3'末端にリボザイム配列を組み込みんだ結果、リボザイム配列無しの場合に比べてウイルスRNA増殖が顕著に増加することを発見した(例えば、上記非特許文献10参照)。

[0023] 本発明者等が開発した上記高効率mRNA増幅系を用いた外来タンパク質の生産方法は、上述のとおり外来タンパク質を高効率・安価・安全に生産するための優れた手段である。

[0024] しかし、形質転換体(細胞)を生産(作出)するにあたり、得られた形質転換体(細胞)のラインによって、ウイルスベクターの発現量および外来タンパクの発現量が大きく異なる場合が多い。この発現量の違いは、導入した転写因子をコードする遺伝子、およびウイルスベクターをコードする遺伝子が、染色体上のどの位置に組み込まれるかに起因するものであると考えられた。すなわち従来のウイルスベクターの導入方法は、ウイルスベクターと転写因子をコードする遺伝子を同一ベクター上で連結し、同時に宿主細胞へ導入していた。したがって、ウイルスベクターと転写因子をコードす

る遺伝子は、染色体上の同一の位置に組み込まれることとなる。

[0025] しかしこのとき、ウイルスベクターの発現に好適な染色体上の位置と転写因子の発現に好適な染色体上の位置とが一致しているとは限らず、例えばウイルスベクターの発現には好適な染色体上の位置に組み込まれていながら転写因子の発現には好適でない場合や、逆に転写因子の発現には好適であるがウイルスベクターの発現には好適でない場合が起こりうる。かかる場合には、形質転換体(細胞)であってもウイルスベクターの誘導発現の効率が低く、外来の目的タンパク質の発現量も低くなってしまう。

[0026] また、導入したベクターが染色体上のどこに組み込まれるかは、現在のところ全くの偶然によるほかはない。かかる事情によって、ウイルスベクターの発現効率・目的タンパク質の発現効率が高い形質転換体(細胞)が得られる確率は非常に低く、所望の形質転換体(細胞)ラインを選抜するためには、多数の形質転換体(細胞)からスクリーニングする必要があった。それゆえ、上記高効率mRNA増幅系を用いてタンパク質の生産を行うためには、多大な時間と労力が必要であった。

発明の開示

[0027] 以上説示したごとく、従来の植物および植物由来細胞を用いたタンパク質の生産方法、およびタンパク質の生産系は、種々の欠点を有し、決して満足のいくものとはなっていなかった。

[0028] 本発明は、上記従来の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、形質転換植物によるタンパク質生産の利点と、ウイルスベクターを用いたタンパク質生産の利点を併せ持つタンパク質の生産系、つまり大規模生産能力、高い生産効率、および安全性の高いタンパク質の生産系、および生産方法等を提供することにある。

[0029] また、本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、上記高効率mRNA誘導増幅系をさらに改良し、形質転換細胞において任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターを転写誘導により効率よく複製させる系を実現することにある。

[0030] さらに、本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、高効率でウイルスベクターを誘導発現し、目的タンパク質を高発現する形質転換体(細胞

)を高確率で生産(作出)することができる方法を開発し、高効率mRNA誘導増幅系を用いたタンパク質生産方法を実現することにある。

[0031] 本発明らは、上記の課題を解決するために、鋭意検討を重ねた結果、ステロイドホルモン等の化学物質で転写誘導をすることができるプロモーターの下流に、外被タンパク質遺伝子をGFP遺伝子に置換した組み換えToMVのcDNAを導入して構築した発現ベクターを、タバコBY-2細胞に導入した形質転換タバコBY-2細胞について、ステロイドホルモンによる転写誘導を行った結果、確かなウイルスRNAの増幅、GFPの誘導発現ができることを発見し、本発明を完成させるに至った。

[0032] また、本発明者らは、従来リボザイムの付加が有効でないと考えられていたトバモウイルス属に属するトマトモザイクウイルスベクターを用いた場合でも、リボザイム配列を付加することにより細胞内でトマトモザイクウイルスベクターcDNAから転写されるウイルスRNAの3'末端に付加されている余分な配列が切断され、大幅にウイルスRNAの蓄積が増加し、トマトモザイクウイルスベクターに挿入した緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子を発現する細胞の割合が10倍以上に増加することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0033] さらに、本発明者らは、転写因子をコードする遺伝子が、当該転写因子の発現に最も適した染色体上の位置に組み込まれた形質転換体(細胞)、換言すれば転写因子を安定的に高生産する形質転換体(細胞)をまず生産(作出)し、上記得られた形質転換体に、目的タンパク質をコードする遺伝子が挿入されたウイルスベクターを導入すれば、高効率でウイルスベクターを誘導発現し、目的タンパク質を高発現する形質転換体(細胞)を高確率で生産(作出)することができることを発見し、本発明を完成させるに至った。

[0034] すなわち本発明は、以下の発明を包含する。

[0035] (1)発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、転写誘導可能なプロモーターとを連結してなる発現ベクターが、生物由来細胞に導入されている形質転換細胞。

[0036] (2)前記植物ウイルスが、トバモウイルス属に属するウイルスである(1)に記載の形質転換細胞。

- [0037] (3) 前記トバモウイルス属に属するウイルスが、タバコモザイクウイルスまたはトマトモザイクウイルスである(2)に記載の形質転換細胞。
- [0038] (4) 上記転写誘導可能なプロモーターとは、化学物質により転写誘導されるプロモーターである(1)〜(3)のいずれかに記載の形質転換細胞。
- [0039] (5) 前記化学物質が、ホルモンである(4)に記載の形質転換細胞。
- [0040] (6) 前記ホルモンが、ステロイドホルモンである(5)に記載の形質転換細胞。
- [0041] (7) 前記生物由来細胞が植物由来細胞である、(1)〜(6)のいずれかに記載の形質転換細胞。
- [0042] (8) 上記(7)の植物由来細胞が、タバコ由来細胞である形質転換細胞。
- [0043] (9) 上記(8)のタバコ由来細胞が、タバコBY-2細胞である形質転換細胞。
- [0044] (10) 上記タンパク質発現用ベクターがアグロバクテリウム法により導入されている(1)〜(9)のいずれかに記載の形質転換細胞。
- [0045] (11) 上記(1)〜(10)のいずれかの形質転換細胞を用いるタンパク質の生産方法。
- [0046] (12) 前記タンパク質の生産方法であって、形質転換細胞の培養工程を含む(11)に記載のタンパク質の生産方法。
- [0047] (13) 前記のタンパク質の生産方法であって、さらに化学物質による転写誘導工程を含む(12)に記載のタンパク質の生産方法。
- [0048] (14) 前記化学物質による転写誘導工程が、ホルモンによる転写誘導工程である(13)に記載のタンパク質の生産方法。
- [0049] (15) 前記ホルモンによる転写誘導工程が、ステロイドホルモン(例えば、エストロゲン等)による転写誘導工程である(14)に記載のタンパク質の生産方法。
- [0050] (16) 上記(11)〜(15)のいずれかのタンパク質の生産方法を行うためのタンパク質生産キット。
- [0051] (17) 前記タンパク質の生産キットであって、(1)〜(10)のいずれかに記載の発現ベクターを含む(16)に記載のタンパク質生産キット。
- [0052] (18) 前記タンパク質の生産キットであって、さらにホルモンを含む(16)または(17)に記載のタンパク質生産キット。

- [0053] (19)前記ホルモンがステロイドホルモンである(18)に記載のタンパク質生産キット。
- [0054] (20)前記タンパク質の生産キットであって、さらに宿主となる生物由来細胞が含まれていること特徴とする(16)ー(19)のいずれかに記載のタンパク質生産キット。
- [0055] (21)前記生物由来細胞が、植物由来細胞である(20)に記載のタンパク質生産キット。
- [0056] (22)前記植物由来細胞が、タバコ由来細胞である(21)に記載のタンパク質生産キット。
- [0057] (23)前記タバコ由来細胞が、タバコBY-2細胞である(22)に記載のタンパク質生産キット。
- [0058] (24)細胞に任意のタンパク質を生産させるために使用するDNA断片であって、RNAを遺伝子とするウイルスに任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAと、上記ウイルスベクターのcDNAの3'末端に結合したリボザイム配列とを有するDNA断片。
- [0059] (25)上記ウイルスベクターは、一本鎖プラス鎖RNAを遺伝子とするウイルス由来である(24)に記載のDNA断片。
- [0060] (26)上記ウイルスベクターは植物ウイルス由来である(24)または(25)に記載のDNA断片。
- [0061] (27)上記ウイルスベクターは、植物のサイレンシングを抑制する因子を持つ植物ウイルス由来である(26)に記載のDNA断片。
- [0062] (28)上記ウイルスベクターは、トバモウイルス属に属するウイルス由来である(27)に記載のDNA断片。
- [0063] (29)上記ウイルスベクターは、タバコモザイクウイルスベクターまたはトマトモザイクウイルスベクターである(28)に記載のDNA断片。
- [0064] (30)上記リボザイム配列は肝炎デルタウイルスのリボザイム配列またはサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列である(24)ー(29)のいずれかに記載のDNA断片。
- [0065] (31)上記任意のタンパク質をコードする遺伝子は、ウイルスの外被タンパク質をコ

- ードする遺伝子のプロモーター下流に挿入される(24)ー(30)のいずれかに記載のDNA断片。
- [0066] (32)上記任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAおよびその3'末端に結合したリボザイム配列は、それらの上流に配置された転写誘導可能なプロモーターにより転写制御される(24)ー(31)のいずれかに記載のDNA断片。
- [0067] (33)さらに上記転写誘導可能なプロモーターの転写を制御するための転写因子をコードする遺伝子を有する(32)に記載のDNA断片。
- [0068] (34)上記転写制御にはステロイドホルモンまたはエストロジェンを用いる(33)に記載のDNA断片。
- [0069] (35)上記転写制御には、ステロイドホルモンで転写誘導活性化される転写因子としてGVGを用い、活性化されたGVGにより転写誘導されるプロモーターとして6XUASgal4を用いる(34)に記載のDNA断片。
- [0070] (36)上記転写制御には、エストロジェンで転写誘導活性化される転写因子としてXVEを用い、活性化されたXVEにより転写誘導されるプロモーターとしてO_{LexA}-46を用いる(34)に記載のDNA断片。
- [0071] (37)上記(24)ー(36)のいずれかに記載のDNA断片を含み、かつ細胞のゲノムに組み込まれる性質を有するベクター。
- [0072] (38)上記ベクターはTiプラスミドである(37)に記載のベクター。
- [0073] (39)少なくとも(24)ー(36)のいずれかに記載のDNA断片、あるいは(37)または(38)に記載のベクターのいずれかを含む形質転換用キット。
- [0074] (40)(24)ー(36)のいずれかに記載のDNA断片、(37)または(38)に記載のベクター、(39)に記載のキットのうち、いずれかを用いることにより得られる形質転換体。
- [0075] (41)ウイルスベクターを転写発現する形質転換体であって、任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターの3'末端にリボザイム配列を結合したDNA断片または当該断片を含むベクターを用いて得られる形質転換体。
- [0076] (42)トバモイルス属由来のウイルスベクターを転写発現する形質転換体であって、

任意のタンパク質コードする遺伝子を挿入したトバモイルス属由来ウイルスベクターの3'末端にリボザイム配列を結合したDNA断片または当該断片を含むベクターを用いて得られる形質転換体。

[0077] (43) 上記形質転換体は植物体または培養細胞である(42)に記載の形質転換体。

[0078] (44) ウイルスベクターを転写誘導できる形質転換体であって、任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターの3'末端にリボザイム配列を結合し、かつウイルスベクターを転写誘導可能なDNA断片または当該断片を含むベクターを用いて得られる形質転換体。

[0079] (45) (40)～(44)のいずれかに記載の形質転換体を用いるタンパク質の生産方法。

[0080] (46) 転写因子をコードする遺伝子と転写因子発現用プロモーターとが連結されてなる転写因子発現用DNA断片を宿主細胞に導入する第一形質転換工程と、前記第一形質転換工程によって得られた形質転換体の中から前記転写因子を発現する形質転換体を選抜する選抜工程と、RNAを遺伝子とするウイルスに任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAと、上記転写因子で転写誘導される転写誘導型プロモーターとが連結されてなるタンパク質発現用DNA断片を、前記選抜工程によって選抜された形質転換体に導入する第二形質転換工程とからなるタンパク質生産用形質転換体の生産方法。

[0081] (47) 上記転写因子が、ホルモンによって活性化される性質を有する(46)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。

[0082] (48) 上記ホルモンが、エストロジェンまたはステロイドホルモンである(47)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。

[0083] (49) 上記エストロジェンで活性化される性質を有する転写因子としてLexA-VP16-hERを用い、上記転写誘導型プロモーターとしてO_{LexA}-46を用いる(48)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。

[0084] (50) 上記ウイルスベクターは、一本鎖プラス鎖RNAを遺伝子とするウイルス由来である(45)～(49)のいずれかに記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。

- [0085] (51) 上記ウイルスベクターが、植物ウイルス由来である(50)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0086] (52) 上記ウイルスベクターが、植物のサイレンシングを抑制する因子を持つ植物ウイルス由来である(51)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0087] (53) 上記ウイルスベクターが、トバモウイルス属に属するウイルス由来である(52)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0088] (54) 上記ウイルスベクターが、トマトモザイクウイルスベクターまたはタバコモザイクウイルスベクターである(53)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0089] (55) 上記ウイルスベクターのcDNAの3'末端に、リボザイム配列が結合している(45)〜(54)のいずれかに記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0090] (56) 上記リボザイム配列が、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列、またはサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列である(55)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0091] (57) 上記任意のタンパク質をコードする遺伝子が、上記ウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子と置換されている(45)〜(56)のいずれかに記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0092] (58) 上記転写因子発現用DNA断片、および上記タンパク質発現用DNA断片が、アグロバクテリウム法により導入されている(45)〜(57)のいずれかに記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0093] (59) 上記宿主細胞および形質転換体が、植物体または植物由来培養細胞である(45)〜(58)のいずれかに記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0094] (60) 上記植物由来培養細胞がタバコ由来細胞である(59)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0095] (61) 上記タバコ由来細胞がタバコBY2細胞である(60)に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [0096] (62) (45)〜(61)のいずれかに記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法によって生産されたタンパク質生産用形質転換体。
- [0097] (63) (62)に記載のタンパク質生産用形質転換体を用いることを特徴とするタンバ

ク質の生産方法。

[0098] (64) (45)ー(63)のいずれかに記載のタンパク質生産用形質転換体の生産キット

[0099] 本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

図面の簡単な説明

[0100] [図1]本発明にかかる形質転換細胞に導入される発現ベクターの一例であるpTA7001-ToMV-erG3(SF3)の構造を示す模式図である。

[図2]実施例において、発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)が導入された形質転換タバコBY-2細胞に対して、ステロイドホルモン処理(DEX処理)の有無におけるGFP遺伝子のmRNAの転写を、ノーザン解析により調べた結果を示す図である。

[図3]実施例において、発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)が導入された形質転換タバコBY-2細胞に対してステロイドホルモン処理(DEX処理)を行った際に、該細胞のGFP発現を蛍光顕微鏡にて観察した結果を示す図である。

[図4]実施例において、継代培養後DEX処理までの前培養日数(前培養3日目、5日目、7日目)とGFPの発現率の関係を調べた結果を示す折れ線グラフである。

[図5(A)]実施例において使用したベクターの構成を示した模式図であって、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列(H-Rz)を付加したベクターの模式図であり

[図5(B)]実施例において使用したベクターの構成を示した模式図であって、サテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列(S-Rz)を付加したベクターの模式図である。

[図6(A)]形質転換したBY2細胞におけるGFPの誘導発現を蛍光顕微鏡で観察した画像であって、コントロールベクターを用いて形質転換した細胞の画像であり

[図6(B)]形質転換したBY2細胞におけるGFPの誘導発現を蛍光顕微鏡で観察した画像であって、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列を付加したベクターを用いて形質転換した細胞の画像であり

[図6(C)]形質転換したBY2細胞におけるGFPの誘導発現を蛍光顕微鏡で観察した画

像であって、サテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を付加したベクターを用いて形質転換した細胞の画像である。

[図7]コントロールベクターを用いて形質転換したBY2細胞、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列を付加したベクターを用いて形質転換したBY2細胞、およびサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を付加したベクターを用いて形質転換したBY2細胞について、GFPを発現している細胞の割合を示したグラフである。

[図8(a)]転写因子発現用DNA断片導入用ベクターpER8(-Stu)の構造を示す模式図であり

[図8(b)]タンパク質発現用DNA断片導入用ベクターpBICER8-ToMVerG3(SF3)SRzの構造を示す模式図である。

[図9(a)]実施例2においてエストロジェンによるToMv特異的RNAの転写誘導をノーザンブロット法により確認した写真図であり

[図9(b)]実施例2においてエストロジェンによるGFPの誘導発現をウエスタンブロット法により確認した写真図である。

発明を実施するための最良の形態

[0101] 本発明の実施の一形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

[0102] 本明細書では、まず、(A)発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結して構築した発現ベクターが生物由来細胞に導入されてなる形質転換細胞(以下本発明にかかる形質転換細胞と称する)、(B)該形質転換細胞を用いたタンパク質の生産方法(以下本発明にかかるタンパク質生産方法と称する)、および(C)該タンパク質の生産方法を行うためのキット(以下本発明にかかるタンパク質生産キットと称する)について説明する。

[0103] (A)本発明にかかる形質転換細胞

本発明にかかる形質転換細胞は、発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結して構築した発現ベクター

が生物由来細胞に導入されてなるものである。

[0104] <ウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルス>

ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)とは、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒト、および植物等の種々の生物が備えている、その生命活動に不適切なRNAを効率的に排除する機能の一つであり、特に生物におけるウイルス感染に対する防御機構のことをいう。

[0105] より具体的には、生物にウイルスが感染すると、生物細胞にとって好ましくないウイルス由来のRNA(mRNAやウイルスゲノムRNA)が多量に生産される。このためウイルスに感染した生物細胞は、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)を機能させ、かかるウイルス由来RNAを駆逐し、ウイルス感染の拡大を防いでいる。

[0106] これに対して、多くのウイルスは、生物細胞におけるウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)を抑制する能力を備えている。すなわちウイルスは、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)による増殖抑制に対抗すべく、それに対するサプレッサー(抑制因子)を発現させる。

[0107] 本発明にかかる形質転換細胞は、植物ウイルスの遺伝子を含む発現ベクターを導入することによりなり、最終的には該ベクターに含まれる目的タンパク質の発現に用いるため、上述のウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)に対するサプレッサー(以下単にサプレッサーと称する)を有する必要がある。

[0108] 本発明に用いる植物ウイルスが、かかるサプレッサーを有しなければ、前述の従来技術に掲げたごとく、目的タンパク質の遺伝子がmRNAレベルで増幅したにも関わらず、時間の経過とともに該RNAがウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)によって分解されてしまい、継続的なタンパク質生産が行えないということとなる。

[0109] よって、本発明において用いる植物ウイルスは、サプレッサーを有することが好ましい。

[0110] ここで、本発明で用いるサプレッサーを有する植物ウイルスとしては、特に限定されるものではないが、例えば、ポティ属(Potyvirus属)ウイルス、ククモウイルス属(Cucumovirus属)ウイルス(例えばキュウリモザイクウイルス(CMVと略す))、ポテックスウイルス属(Potexvirus属)ウイルス(例えばジャガイモXウイルス(PVXと略す))、トン

” ブスウイルス属 (Tombusvirus属) ウイルス(例えばトマトブッシースタントウイルス (TBSVと略す)、Cymbidium ringspot virus (CymRSVと略す))、カルモウイルス属 (Carmovirus属) ウイルス(例えば、Turnip crinkle virus (TCVと略す))、トバモウイルス属 (Tobamovirus属) ウイルス(例えば、タバコモザイクウイルス (TMVと略す)、トマトモザイクウイルス (ToMVと略す))が挙げられる。

[0111] 後述する実施例において、ToMVを用いて発現ベクターを構築しているが、当該ウイルスは、(ア)他のウイルスと比較して増殖能が高く、タンパク質の大量生産が期待できること、(イ)該実施例において宿主として用いたタバコBY-2細胞での増殖能が高いこと、および(ウ)従来から広く使用されており、取り扱い性、汎用性、応用性に富むという理由から採用した。

[0112] 上記サプレッサーを有する植物ウイルスを用いることによって、増幅した目的タンパク質のmRNAは、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)によって分解されることなく、継続的なタンパク質の高生産が行うことが可能である。

[0113] なお、ここで植物ウイルスとは、植物を宿主とするウイルスの総称であり、狭義には、高等植物のウイルスを指す。ウイルスに感染した植物は、モザイク、退緑、黄化、奇形、巻葉、矮化、壊死などのウイルスの種類と寄生植物の組み合わせによって、種々の異なる病徴を示し、栽培作物の品質や、収穫に甚大な被害を与える。ウイルスの伝播様式には、汁液伝播、虫媒伝播、土壌伝播、接木伝播、種子伝播などがある。ある種のウイルスは、媒介昆虫体内でも増殖し、経卵伝染するものもある。

[0114] <発現ベクターの構築>

発現させる目的タンパク質は、生物由来細胞中で発現可能であるタンパク質であれば、特に限定されるものではない。例えば、医薬品に利用可能な有用酵素、インターフェロン、アレルゲンタンパク質、病原体の抗原、エリスロポエチン、エンケファリン、細胞増殖因子、抗体(免疫グロブリン)、アルブミン等が挙げられる。上記タンパク質が発現した生物由来細胞を適量摂取することにより、該タンパク質を摂取するのと同様の効果が得られるといった医薬品としての利用が可能となる。

[0115] 発現させる目的タンパク質をコードする遺伝子は、前述のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子の一部との置換、または該ウイルスの遺伝子に連結するなど通

常の遺伝子組み換え技術を用いて導入すればよい。

- [0116] 本発明にかかる形質転換細胞に導入する発現ベクターは、上記目的タンパク質をコードする遺伝子が導入された組み換え植物ウイルスの遺伝子を、転写誘導可能なプロモーターの下流に連結して構築すればよい。かかる転写誘導可能なプロモーターを用いることによって、その下流に連結した植物ウイルス由来のタンパク質が高効率に誘導発現される。
- [0117] かかる転写誘導可能なプロモーターおよびベースとなるベクターは特に限定されるものではなく、従来公知の転写誘導可能なプロモーターおよびベクターを用いることができる。
- [0118] 転写誘導可能なプロモーターとしては、例えば、化学物質や温度によって転写が誘導されるプロモーターを挙げることができる。かかる誘導可能なプロモーターは、数多くの真核細胞(植物及び動物細胞を含む)に対して、当該技術分野で既知であり、これらのプロモーターを好適に利用可能である。例えば、薬剤誘導性(テトラサイクリン誘導性)、ホルモン誘導性、グルココルチコイド誘導性、金属(金属イオンを含む)誘導性のプロモーター系、及び熱ショック誘導性のプロモーター系が含まれる。
- [0119] なかでも、後述する実施例に示すように、特に、ホルモンにより転写誘導されるプロモーターが好ましい。ホルモンにより転写誘導されるプロモーターとしては、例えば、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpTA7001(McNellis TW, Mudgett MB, Li K, Aoyama T, Horvath D, Chua NH, Staskawicz BJ. Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic Arabidopsis induces hypersensitive cell death. Plant J. 1998 Apr;14(2):247-57. 参照)から本発明者等が構築したpTA7001(Stu)、およびエストロジェンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpER8(Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant J. 24, 265-273. 参照)等を好適に用いることができる。また、その他形質転換用のベクターの例としては、他の形質転換用ベクターとしては、エクジソンで転写誘導されるプロモーターを持つプラスミド、pES60およびpES46(The Plant Journal (1999) 19: 97-106. Ecdysone agonist inducible

transcription in transgenic tobacco plants Alberto Martinez, Caroline Sparks, Cliff A. Hart, John Thompson and Ian Jepson)がある。

[0120] また該発現ベクターには、プロモーターの転写因子を含んでいることが好ましい。転写因子によって、プロモーターの下流に連結した植物ウイルスの遺伝子の転写調節が行われ、さらに高効率に転写を誘導することが可能となるからである。該転写因子は、使用するプロモーターに対応して選択すればよい。例えば、前述のステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpTA7001 (Stu)を用いた場合の転写因子はGVGであり、エストロジェンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpER8を用いた場合は、XVEである。

[0121] また該発現ベクターには、その他種々のDNAセグメントが含まれていてもよい。DNAセグメントとしては、例えば、ターミネーターを挙げることができる。また、必要に応じて、キメラタンパク質を発現させるために、他のタンパク質をコードする遺伝子や、このような遺伝子を導入するための制限酵素認識部位(マルチクローニングサイト等)を含んでいてもよい。

[0122] 上記発現ベクターを構築する方法(作製方法)は具体的には特に限定されるものではなく、組み換えウイルス遺伝子およびプロモーター等のDNAセグメントと、上述したベースとなるベクターとを、公知の組換えDNA技術を用いてつなげればよい。また、構築された発現ベクターの増殖方法(生産方法)も特に限定されるものではなく、公知の方法を用いることができる。一般的には大腸菌を宿主として当該大腸菌細胞内で増殖させればよい。このときベクターの種類に応じて、好ましい大腸菌の種類を選択してもよい。

[0123] <形質転換方法>

構築された発現ベクターを宿主(宿主)となる植物由来細胞へ導入する具体的な手法は特に限定されるものではなく、宿主となる植物由来細胞の種類に応じた適切な形質転換方法を用いればよい。植物由来細胞への一般的な形質転換法としては、アグロバクテリウムを用いた形質転換法(アグロバクテリウム法)を挙げることができ、後述する実施例に示すように、本発明でもアグロバクテリウム法を好適に用いることができる。またその他パーティクルガンによる方法、プロトプラスト/スフェロプラスト法、

エレクトロポレーション法(電気穿孔法)、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

- [0124] 組み換え植物ウイルス遺伝子(発現ベクター)が宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認する方法は、特に限定されるものではなく、公知の各種の方法を用いることができる。具体的には、各種マーカーを用いればよい。例えば、宿主細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと組み換え植物ウイルス遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。
- [0125] 例えば後述する実施例においては、薬剤耐性マーカー(ハイグロマイシン耐性遺伝子、Hyg^r)を用いており、ハイグロマイシンを含有する培地中で、形質転換候補株を培養することにより、生育してきた細胞株を形質転換体として選抜することが可能となる。その他のマーカーとしては、ビアラホス耐性マーカー、カナマイシン耐性マーカー等が植物細胞の選抜に有効であり、ピューロマイシン耐性マーカー、ブレオマイシン耐性マーカー、XGPRT遺伝子、DHFR遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子等が動物細胞の選抜には有効である。さらに酵母などでは、ウラシル要求性マーカーをはじめとする栄養要求性マーカーを選抜に用いることができる。但しこれら形質転換体の選抜方法は、限定されるものではなく、発現ベクターを導入する宿主等に応じて適宜選択して用いればよい。
- [0126] その他、宿主細胞から調製したゲノムDNAを鋳型とし、導入したタンパク質の遺伝子全長を特異的に増幅するいわゆるジェノミックPCR法を挙げることができる。この方法によって、目的タンパク質をコードする遺伝子が増幅されてくることを電気泳動法等によって確認できれば、該遺伝子の導入を確認することができる。
- [0127] また、その他の方法としては、あるいは、目的タンパク質を融合タンパク質として発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質GFP(Green Fluorescent Protein)をマーカーとして用い、目的タンパク質をGFP融合タンパク質として発現させてもよい。さらに、発現ベクターには、形質転換植物細胞における発現部位を可視化してモニターするための遺伝子を導入することもできる。このような遺伝

” 子の一例としては、 β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子を挙げることができる。

[0128] <宿主細胞>

また、発現ベクターが導入される宿主細胞としては、生物由来細胞であれば特に限定されるものではなく、動物由来細胞であっても植物由来細胞であってもよい。ただし、植物由来細胞は、動物由来細胞に比して、増殖速度が速くコンタミネーションのリスクが少ない点、培地作成費用が非常に安価であるという点において、植物由来細胞がより好ましい。ここで、動物由来細胞、および植物由来細胞とは、それぞれ動物個体、および植物個体を除く細胞、組織、並びに器官も含む意味である。特に液体培地等で培養可能な細胞が好ましい。

[0129] また由来となる動物としては、特に限定されるものでないが、ヒト、サル、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、チャイニーズハムスター、ウシ、ウマ、ブタ、メダカやゼブラフィッシュ等の魚類、カイコ、夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)等が挙げられる。また由来となる植物としては、特に限定されるものではないが、イネ、シロイヌナズナ、オオムギ、コムギ、タバコ、トマト、キュウリ、ダイズ、ジャガイモ、トウモロコシ、ニチニチソウ、シロイヌナズナ、アルファルファが挙げられる。

[0130] その他、枯草菌や乳酸菌などの菌類、酵母など単細胞生物が宿主細胞として利用できる。

[0131] また動物由来細胞の例としては特に限定されるものではないが、HeLa細胞、CHO細胞、メラノーマ細胞、マウス3T3細胞が挙げられる。また植物由来細胞の例としては、タバコBY-2細胞、ジャガイモ由来、イネ由来、サツマイモ由来、ダイズ由来、パセリ由来、シロイヌナズナ由来、コムギ由来、トウモロコシ由来細胞、ニチニチソウ由来細胞が挙げられる。

[0132] 後述する実施例において、タバコBY-2細胞を宿主として用いている。タバコBY-2細胞(Toshiyuki Nagata, Yasuyuki Nemoto, and Seiichiro Hasezawa “Tobacco BY-2 Cell Line as the “Hela” Cell in the Cell Biology of Higher Plants” International Review of cytology, vol.132, p.p. 1-30 (1992) 、および <http://www.riken.go.jp/r-wprld/info/release/press/2003/030620/> 参照)は、植物培養細胞株としては、世界中で最も広く用いられているものであり、最も増殖速度が速

いこと、遺伝子操作が容易なこと、大量培養を容易に行うことができるという理由から採用した。

[0133] また本発明において植物個体ではなく、植物由来細胞を宿主としているが、それは以下に示す利点を有するからである。

[0134] (a)植物個体を宿主とする場合と比較して、増殖速度が速く、形質転換細胞を短期間で増殖することができる。また大規模化、大量生産も容易である。

[0135] (b)植物個体を宿主とする場合と比較して、生育させるための広大なスペース、施設(畑、温室)等を必要としない。また培養装置を容易に大型化することが可能である。

[0136] (c)植物個体を宿主とする場合と比較して、カルスから植物個体を分化させる工程、花を咲かせて種子をとる工程、該種子を蒔いて増殖させるという工程が無い場合、形質転換体の作成、スクリーニング、タンパク質生産の期間を著しく短縮することができる。

[0137] (d)化学物質等の誘導物質によるタンパク質誘導発現が簡便に行うことができる。植物個体を宿主とする場合は、植物個体に化学物質等を直接塗布、散布等の方法によって、該植物個体全体に均一に投与する必要があるが、非常に手間と時間がかかる。一方、植物由来細胞を宿主とした場合は、細胞培養の際に、該誘導物質等を培地中に添加するだけで足り、前細胞に対して、同時かつ均一に誘導をかけることが可能となる。

[0138] (e)植物個体は、蒸散作用等によって厳密な表面温度の管理が困難であるが、液体培地中で生育する培養細胞の場合は、温度管理等が容易である。環境条件の変化等による種々のストレスに感受性の高いプロモーターを用いた際に、安定的にタンパク質の生産が行うことが可能である。

[0139] (f)種々の組織からなる植物個体とは異なり、培養細胞は均質であるため、組織特異的な影響が無く、タンパク質の発現コントロールが容易である。

[0140] (g)細胞周期を高度に同調化できるため、厳密なタンパク質発現をコントロールすることが可能となる。

[0141] (h)液体培養であるため、分泌型タンパク質を培地中に分泌させることによって、タンパク質の回収、精製が容易である。また、目的タンパク質が、分泌型タンパク質でな

” い場合であっても、分泌型のタグを目的タンパク質に付加することによって、同様の効果が得られる。

[0142] (i)植物個体と異なり、培養細胞は生育に光を必要としないため、照明設備、および照明にかかるコストを削減することが可能である。また、光に感受性なタンパク質を発現させる場合にも有利である。

[0143] (j)培地中に種々の化学物質等を添加することによって、生産するタンパク質を化学修飾することが可能である。例えば、放射性同位元素を添加することによって、放射性標識がされたタンパク質を容易に作成することが可能となる。

[0144] (k)形質転換体が外界に漏出した場合であっても、植物個体とは異なり自生することができず、死滅するために安全である。このことにより、植物個体、種子、花粉等の飛散防止、安全性試験、遺伝子組み換え生物に対するリスク管理に要する設備、費用、時間が軽減できる。

[0145] (B)本発明にかかるタンパク質生産方法

本発明にかかるタンパク質生産方法は、前述の本発明にかかる形質転換細胞を用いて行われる。本発明にかかるタンパク質の生産工程においては、形質転換の際に取得した形質転換細胞を培養せずに細胞中のタンパク質を取得してもよい。しかし、本発明にかかるタンパク質生産方法には、本発明にかかる形質転換細胞を培養する工程(以下細胞培養工程と称する)が含まれていることが好ましい。かかる培養工程によって、目的タンパク質をコードする遺伝子が導入された形質転換細胞数を増加させることができ、該タンパク質の生産量を増加させることが可能となるからである。

[0146] かかる細胞培養工程における細胞培養の方法は特に限定されるものではなく、培養する細胞に好適な培地、培養条件を適用して行えばよい。植物細胞を培養する際の培地としては、限定されるものではないが、無機塩類、炭素源、ビタミン類、アミノ酸が加えられている場合がある。さらに、ココナツミルクや酵母エキスを加えて成長を促進させる場合がある。その他、オーキシシンとサイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン等の植物ホルモンを添加する場合がある。また培養条件であるが、光、温度、通気の有無等を培養する細胞に応じて最適なものを採用すればよい。例えば、後述する実施例において、タバコBY-2細胞を培養する際には、370mg/リン酸二

水素カリウム、1mg/1チアミン塩酸、3%スクロース、0.2mg/1 2, 4-Dを含むMS培地を用い、暗所、26℃、135回転/分で旋回振盪培養後、1/100量を一週間ごとに継代している。

[0147] 一方、動物細胞を培養する際の培地としては、限定されるわけではないが、アミノ酸、ビタミン類、ブドウ糖、塩類に、血清が加えられている場合がある。その他、緩衝液として重炭酸/炭酸ガス系緩衝液が用いられており、培養器として、CO₂インキュベーターが用いられている。またpHのモニター用にフェノールレッドを添加する場合がある。培養条件は、一般的には37℃で培養するが、細胞株によっては、28℃、40℃の場合がある。

[0148] 本発明にかかるタンパク質生産方法においては、上記細胞培養工程に加えさらに、培養された細胞に対して、化学物質による転写誘導を行う工程、特に、ホルモン(例えば、エストロジェン等)による転写誘導を行う工程(以下転写誘導工程)が含まれることが好ましい。前述の本発明にかかる形質転換細胞に導入された発現ベクターには、ホルモンで転写誘導されるプロモーターが含まれているため、該転写誘導工程によって、目的タンパク質をコードする遺伝子の転写の開始、転写量の増加およびコントロール等が可能となり、タンパク質の生産量の増加、タンパク質の生産量のコントロールができる。

[0149] 本転写誘導工程に用いるホルモンは特に限定されるものではなく、本発明にかかる形質転換細胞に導入された発現ベクターに含まれるプロモーターに応じて、適宜選択すればよい。例えば、ステロイドホルモン、エストロジェン、エクジソン等がある。

[0150] 後述の実施例においては、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpTA7001(Stu)をベースとしてタンパク発現ベクターを構築していることから、ステロイドホルモンによって誘導を行っている。

[0151] また本転写誘導工程に用いるホルモンの量については、プロモーターの種類、細胞株の種類、細胞株の培養フェーズ、細胞の培養条件等に応じて適宜選択すればよい。例えば、後述する実施例においては、30 μMの濃度のステロイドホルモン(デキサメタゾン)を用いて本転写誘導工程を行っている。

[0152] さらに本転写誘導工程を行う時期についても、特に限定されるものではなく、細胞

株の種類、細胞株の培養フェーズ、細胞の培養条件等に応じて適宜選択すればよい。例えば後述する実施例においては、継代培養後5日目において転写誘導を行った場合が最もレポータータンパク質であるGFPを発現した細胞の割合が高いという結果であった。このことより、本実施例の条件においては、前培養5日目における培養細胞の生理的条件が、転写誘導とタンパク質の発現に適していたことがいえる。

[0153] (C)本発明にかかるタンパク質生産キット

本発明にかかるタンパク質生産キットは、前記本発明にかかるタンパク質生産方法を行うことができる試薬、器具、装置等が含まれていればよく、特に限定されるものではないが、本発明にかかる形質転換細胞に導入されている発現ベクターを含んでいることが好ましい。この場合は、該発現ベクターに発現しようとする目的タンパク質をコードする遺伝子を、連結または置換等の通常の遺伝子組み換え技術を用いて導入することで、目的タンパク質の生産を行うことが可能となる。

[0154] 例えば、ステロイドホルモンで転写誘導をすることができるプロモーターの下流に、外被タンパク質遺伝子をGFP遺伝子に置換した組み換えToMVのcDNAを導入して構築した発現ベクターが含まれていてもよい。かかる場合は、GFP遺伝子と発現しようとする目的タンパク質遺伝子とを置換してもよいし、GFP遺伝子に連結してもよい。GFP遺伝子に連結した場合は、目的タンパク質がGFPとの融合タンパク質として取得され、GFPの蛍光を指標として、発現をモニターしながらタンパク質生産が可能となる。

[0155] また本発明にかかるタンパク質生産キットには、さらに、前述の転写誘導工程を行うためのホルモンが含まれていることも好ましい。該キットに含まれているホルモンについては、前述と同様、本発明にかかる形質転換細胞に導入された発現ベクターに含まれるプロモーターに応じて、適宜選択すればよい。例えば、ステロイドホルモン、エストロジェン、エクジソン等がある。

[0156] 例えば後述の実施例において示すごとく、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpTA7001(Stu)をベースとしてタンパク発現ベクターを構築している場合は、ステロイドホルモンが含まれていることが好ましいといえる。

[0157] また本発明にかかるタンパク質生産キットには、さらに、宿主となる生物由来細胞が

含まれていてもよい。該キットに含まれる宿主細胞としては、生物由来細胞であれば特に限定されるものではなく、動物由来細胞であっても植物由来細胞であってもよい。また由来となる動物としては、特に限定されるものでないが、ヒト、サル、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、チャイニーズハムスター、ウシ、ウマ、ブタ、メダカやゼブラフィッシュ等の魚類、カイコ、夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 等が挙げられる。また由来となる植物としては、特に限定されるものではないが、イネ、シロイナズナ、オオムギ、コムギ、タバコ、トマト、キュウリ、ダイズ、ジャガイモ、トウモロコシ、ニチニチソウ、シロイヌナズナ、アルファルファが挙げられる。

[0158] その他、枯草菌や乳酸菌などの菌類、酵母など単細胞生物が宿主細胞の例として挙げられる。

[0159] また動物由来細胞の例としては特に限定されるものではないが、HeLa細胞、CHO細胞、メラノーマ細胞、マウス3T3細胞が挙げられる。また植物由来細胞の例としては、タバコBY-2細胞、ジャガイモ由来、イネ由来、サツマイモ由来、ダイズ由来、パセリ由来、シロイヌナズナ由来、コムギ由来、トウモロコシ由来細胞、ニチニチソウ由来細胞が挙げられる。

[0160] そのほか本発明にかかるタンパク質生産キットには、また生物由来細胞を培養するための培地、および培養器等が含まれていてもよい。

[0161] 以上説示した発明によれば、大規模生産能力、高い生産効率、および安全性の高いタンパク質の生産系、および生産方法等を提供することが可能であることは明白である。

[0162] 次に、(D)高効率mRNA誘導増幅系について説明した後、(E)本発明に係るDNA断片および当該DNA断片を含むベクター、(F)植物細胞形質転換用キット、(G)形質転換体およびタンパク質生産方法について説明する。

[0163] (D)高効率mRNA誘導増幅系

植物に任意の有用タンパク質を生産させるため、発明者らは大規模生産能力、高生産効率および安全性を併せ持つタンパク質合成系である、高効率mRNA誘導増幅系を構築した。以下に、発明者らが構築したブロムモザイクウイルスを用いた高効率mRNA誘導増幅系の概略を説明する(非特許文献6参照)。ブロムモザイクウイル

ス是非常に高い複製能力を持つウイルスで、一本鎖プラス鎖RNAを遺伝子とし、複製酵素の1aおよび2aタンパク質をそれぞれコードするRNA1およびRNA2、細胞間および全身移行に必要な3aと外被タンパク質をコードするRNA3からなる。外被タンパク質はRNA3のマイナス鎖からウイルスの複製酵素により合成されるサブゲノムmRNAから翻訳される。そこで、RNA1のcDNA、RNA2のcDNAおよび外被タンパク質遺伝子を、有用タンパク質をコードする遺伝子で置換したキメラRNA3のcDNAとをそれぞれ植物細胞に導入し、3種のウイルスRNA遺伝子を持つ形質転換植物を作製した。RNA2およびキメラRNA3はカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを用いて恒常的に発現させ、RNA1はステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターにより発現を制御した。これにより、ステロイドホルモンで処理した場合のみウイルスの複製酵素が形成され、有用タンパク質のmRNAが増幅される、高効率mRNA誘導増幅系が構築できた。

[0164] この高効率mRNA誘導発現系の特徴は以下のとおりである。

- 1) 非常に効率よく有用タンパク質のmRNAを発現できる。
- 2) 有用タンパク質の発現は、誘導制御できる。
- 3) 発現制御が可能なことにより、植物の生長に毒性を持つタンパク質の合成を可能にする。
- 4) 圃場等の開放系では発現を抑制し、工場などの閉鎖系で誘導生産できることから、高い安全性を持つ。
- 5) 導入された増幅可能なウイルス遺伝子は、外被タンパク質を持たないため、他の植物への感染能力がなく、さらに粒子化できないことから安全である。

[0165] しかし、プロムモザイクウイルスの系では増幅の後半にmRNAの分解が顕著に認められる。これは、プロムモザイクウイルスが、植物が有するウイルス抵抗性(サイレンシング)に対するサプレッサーを持たないことに起因すると考えられる。そこで発明者らはサイレンシングのサプレッサーを持ち、かつ複製能力の高い一本鎖プラス鎖RNAウイルスであるトマトモザイクウイルス(以下適宜「ToMV」と略記する。)を用いて高効率mRNA誘導増幅系の構築を行った。ここで「サイレンシング」とは植物が有するウイルス防御機構の一つで、外来遺伝子の発現が抑制される現象を意味する。

[0166] ブロムモザイクウイルスをトモモザイクウイルスに変更することにより、増幅の後半に mRNA が分解されるという現象は解消された。しかしながら、ToMV を用いた高効率 mRNA 誘導増幅系をタバコ培養細胞である BY2 細胞に構築することを試みたところ、ウイルスベクターが増幅された細胞は最高 5% であり、多くの細胞でウイルスベクターの増幅が認められなかった。この現象の一因としては、細胞内で cDNA から転写されるウイルス RNA の 3' 末端にターミネーター由来の配列とポリ A 配列が付加されていることが考えられた。そこで発明者らは、ウイルスベクターの cDNA の 3' 末端にリボザイム配列を付加した DNA 断片を構築した。「リボザイム」とは酵素活性を有する RNA 分子を意味し、本明細書においては自己切断反応を触媒する RNA をいう。本ベクターを用いることにより、細胞内で cDNA から転写されるウイルス RNA の 3' 末端に付加された余分な配列が切断され、ウイルス RNA が増幅される細胞の割合が大幅に増加する。

[0167] (E) 本発明に係る DNA 断片および当該 DNA 断片を含むベクター

本発明に係る DNA 断片は、細胞に任意のタンパク質を生産させるために使用する DNA 断片であり、その構成には少なくとも細胞に生産させようとする任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入した、RNA を遺伝子とするウイルスベクターの cDNA と、その 3' 末端に結合したリボザイム配列とを有することが必要である。細胞に生産させる任意のタンパク質は特に限定されるものではなく、外来の有用タンパク質であってもよく、当該植物が本来有するタンパク質であってもよい。例えば、医薬品として利用可能なヒトのタンパク質等が好適である。

[0168] ウイルスベクターとしては、RNA を遺伝子とするウイルス由来のウイルスベクターであれば特に限定されるものではなく、二本鎖 RNA ウイルス、一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルス、一本鎖プラス鎖 RNA ウイルス由来のウイルスベクターを用いることができる。中でも細胞内で cDNA から転写された RNA 自体が mRNA として機能するという理由から、一本鎖プラス鎖 RNA を遺伝子とするウイルス由来のウイルスベクターであることが特に好ましい。一本鎖プラス鎖 RNA ウイルスは、複製能力が高く、目的タンパク質の高生産が可能となる。

[0169] また、ウイルスベクターは植物ウイルス由来のウイルスベクターに限定されるもので

はなく、動物ウイルス、ファージを含むあらゆるRNAウイルス由来のウイルスベクターを用いることが可能である。しかしながら、植物細胞に任意のタンパク質を生産させる目的で使用する場合には、植物ウイルス由来のウイルスベクターであることが好ましく、中でも植物のサイレンシングを抑制する因子(サプレッサー)を持つウイルス由来のウイルスベクターであることが特に好ましい。サイレンシングのサプレッサーを持つウイルスベクターを用いることにより、増幅の後半においてもmRNAが分解される現象が生じない。サイレンシングのサプレッサーを持つ植物ウイルスとしては、例えば、ポティ属(Potyvirus属)ウイルス、クモウイルス属(Cucumovirus属)ウイルス(例えばキュウリモザイクウイルス(CMV))、ポテックスウイルス属(Potexvirus属)ウイルス(例えばジャガイモXウイルス(PVX))、トンプスウイルス属(Tombusvirus属)ウイルス(例えばトマトブッシースタントウイルス(TBSV)、Cymbidium ringspot virus (CymRSV))、カルモウイルス属(Carmovirus属)ウイルス(例えば、Turnip crinkle virus (TCV))、トバモウイルス属(Tobamovirus属)ウイルス(例えば、タバコモザイクウイルス(TMV)、トマトモザイクウイルス(ToMV))が挙げられる。

- [0170] 本発明に係るDNA断片に用いるリボザイム配列としては、任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAから転写されたウイルスRNAの3'末端に付加された余分な配列を切断できるものであればよく、特に限定されるものではない。例えば、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列またはサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を用いることができる。
- [0171] 上記構成とすることによって、形質転換体の細胞内でcDNAから転写されるウイルスRNAの3'末端に付加され、ウイルスの複製能力低下の原因となるターミネーター由来の配列やポリA配列を切断することができる。それゆえウイルスの複製能力の低下を防止することができ、外来タンパク質の高生産が可能となる。
- [0172] 任意のタンパク質をコードする遺伝子は、ウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターの下流に挿入されることが好ましく、ウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子と置換するように挿入されることが特に好ましい。この部位に挿入することによりウイルスの外被タンパク質が産生されなくなり、増幅されるウイルス遺伝子は粒子化されず他の植物に感染することがなくなるため、ウイルスの外界への飛散と

いう問題を解消することが可能となる。また、ウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターは強力であり、任意のタンパク質を高効率に生産することが可能となる。

[0173] 任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAおよびその3'末端に結合したリボザイム配列は、転写誘導可能なプロモーターにより転写が制御されることが好ましい。そのため、本発明に係るDNA断片の構成には転写誘導可能なプロモーターが含まれることが好ましい。したがって、本DNA断片は当該転写誘導可能なプロモーターの下流に任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAおよびその3'末端に結合したリボザイム配列が配置される構成となる。転写誘導可能なプロモーターを用いることにより、圃場等の開放系では発現を抑制し、工場などの閉鎖系で誘導生産できる。また、植物の生長に毒性を持つタンパク質の生産も植物が完全に生長した後に生産を誘導することにより可能となる。転写誘導可能なプロモーターとしては特に限定されるものではなく、このような性質を有する公知のプロモーターを使用すればよい。例えば、上述した転写誘導可能なプロモーターを挙げることができる。具体的には、テトラサイクリン等の薬剤誘導性プロモーター、熱ショック誘導性プロモーターの他、ステロイドホルモンで転写誘導可能なプロモーターやエストロジェンで転写誘導可能なプロモーターを好適に用いることができる。具体的には、ステロイドホルモンで転写誘導可能なプロモーターとして6XUASgal4、エストロジェンで転写誘導可能なプロモーターとしてOLexA-46、エクジソンで転写誘導可能なプロモーターとしてGREを挙げることができる。

[0174] 上記転写誘導可能なプロモーターを用いて転写を制御する場合、転写誘導物質により活性化される転写因子が必要である。したがって、本発明に係るDNA断片の構成には転写誘導物質により活性化される転写因子をコードする遺伝子が必要である。転写因子は用いるプロモーターに適したものを選択して使用すればよい。例えば、ステロイドホルモンで転写誘導可能なプロモーターである6XUASgal4を用いる場合には、転写因子としてはGVGが選択され、エストロジェンで転写誘導可能なプロモーターであるOLexA-46を用いる場合には、転写因子としてはXVEが選択され、エクジソンで転写誘導可能なプロモーターとしてGREを用いる場合には、転写因子としては

” エクジソンレセプターGR Act and DBDとヘルペスウイルストランスアクチベーションドメインHecR LBDのキメラタンパク質が選択される。転写因子をコードする遺伝子は、植物に広く使用されているプロモーター、例えばカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に配置することが好ましい。この位置に配置することにより、転写因子は恒常的に発現するが、常に不活性化された状態で存在する。この状態においてステロイドホルモン等の誘導剤で処理を施すと不活性化されていた転写因子が活性化され、プロモーター下流の遺伝子が転写される。

[0175] 本発明に係るベクターは、上記構成を有するDNA断片を含み、かつ細胞のゲノムに組み込まれる性質を有することを特徴とする。ゲノムに組み込まれることにより、細胞分裂後の娘細胞にもベクターの構成に含まれる遺伝子を確実に伝達することが可能となり、タンパク質の生産効率を維持することが可能となる。ゲノムは染色体(核ゲノム)に限定されるものではなく、ミトコンドリアゲノムや葉緑体ゲノムも含まれる。上記DNA断片以外のベクター配列としてはゲノムに組み込まれる性質を有する公知のベクターを使用すればよく、特に限定されるものではない。植物細胞のゲノムに組み込まれる性質を有するベクターとして、例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)のTiプラスミドを挙げることができる。

[0176] なお、上記DNA断片およびベクターの構築方法は特に限定されるものではなく、公知の遺伝子工学的手法を用いればよい。

[0177] (F)植物細胞形質転換用キット

上記DNA断片およびベクターは有用な任意のタンパク質を生産する細胞を作製するために利用できるものである。したがって、上記DNA断片またはベクター、および細胞の形質転換に必要な試薬、器具等をキット化しておけば、利用者は上記DNA断片またはベクターを導入した形質転換体を簡便に作製することが可能となる。

[0178] 本発明に係る形質転換用キットは、少なくとも上記DNA断片またはベクターを含むものであればよく、他にどのような構成を有していてもよい。DNA断片またはベクター以外のキット構成としては、例えば、細胞、培地、制限酵素、修飾酵素類、転写誘導用化学物質(ステロイドホルモン、エストロジェン等)、培養フラスコ、アグロバクテリウム(植物細胞の場合)等を挙げることができる。

[0179] (G)形質転換体およびタンパク質生産方法

本発明に係る形質転換体は、上記DNA断片またはベクターを植物細胞に導入することにより、または上記植物細胞形質転換用キットを使用することにより得られる形質転換体である。当該形質転換体を得ることにより、目的の有用タンパク質を生産することが可能となる。

[0180] 形質転換方法は特に限定されるものではなく、宿主となる細胞の種類に応じた適切な形質転換方法を用いればよい。特別なベクター配列を有しないDNA断片を用いる場合には、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム法等を用いることができる。植物由来細胞への一般的な形質転換法としては、アグロバクテリウムを用いた形質転換法(アグロバクテリウム法)を挙げることができ、本発明でもアグロバクテリウム法を好適に用いることができる。アグロバクテリウム法を用いて形質転換する場合には、本発明にかかるDNA断片を含むTiプラスミドを構築する必要がある。

[0181] 宿主となる細胞の種類は特に限定されるものではなく、動物由来細胞であっても植物由来細胞であってもよい。目的のタンパク質を生産するために適した細胞を適宜選択して用いればよい。また、形質転換体は培養細胞でもよく、個体(動物個体、植物個体)であってもよい。植物において、好適に形質転換体を得ることが可能な培養細胞としてはタバコ由来のBY2細胞を挙げることができ、植物個体としてはタバコを挙げることができる。ただし、これらに限定されるものではない。なお、上述したように、BY2細胞は、植物培養細胞株として世界中で最も広く用いられているものであり、最も増殖速度が速いこと、遺伝子操作が容易なこと、大量培養を容易に行うことができること等の特徴を持つ。

[0182] 本発明に係る形質転換体が有する、従来にない特徴を以下に示す。

I) ウイルスベクターを転写発現する形質転換培養細胞においてリボザイム配列を用いた点。

II) トバモウイルス属由来のウイルスベクターを転写発現する形質転換体(培養細胞および植物個体)においてリボザイム配列を用いた点。

III) ウイルスベクターを転写誘導できる形質転換体においてリボザイム配列を用いた

点。

- [0183] 発明者らが構築した本発明に係る形質転換細胞は、上記、従来にない特徴を併せ持つものである。すなわち、外来遺伝子を挿入したトバモウイルス属由来のToMVベクターにリボザイム配列を結合し、ステロイドホルモンで転写誘導可能なプロモーターの下流に配置したDNA断片を含むベクターで形質転換したBY2細胞である。なお、植物培養細胞を用いて有用タンパク質を生産する場合の利点、特に植物個体を用いる場合との比較における利点は、上述した(a)〜(k)のとおりである。
- [0184] さらに、植物培養細胞を用いた系では、同じ真核型である動物培養細胞を用いた系と比較して場合、培地作成費用が非常に安価であり、大規模化に適する。
- [0185] また、RNAを遺伝子とする植物ウイルスは人為的な接種あるいは形質転換によって、酵母など植物以外の真核細胞でも増殖することが示されていることから、本発明を応用すればBY2細胞以外の植物培養細胞はもとより、他の真核細胞でも同様の誘導ウイルスベクター系を構築することが可能である。
- [0186] また、本発明には上記形質転換体を用いてタンパク質を生産する方法が含まれる。
- [0187] 次に、(H)本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産方法、(I)本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体およびその利用、(J)本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産キットについて説明する。
- [0188] (H)本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産方法
本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産方法(以下、本形質転換体の生産方法と称する)は、(1)転写因子をコードする遺伝子と転写因子発現用プロモーターとが連結されてなる転写因子発現用DNA断片を細胞に導入する第一形質転換工程と、(2)前記第一形質転換工程によって得られた形質転換体の中から前記転写因子を発現する形質転換体を選抜する選抜工程と、(3)RNAを遺伝子とするウイルスに任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAと、上記転写因子で転写誘導される転写誘導型プロモーターとが連結されてなるタンパク質発現用DNA断片を、前記選抜工程によって選抜された形質転換体に導入する第二形質転換工程とからなる。以下、工程ごとに説明する。
- [0189] (H-1)第一形質転換工程

本第一形質転換工程では、転写因子をコードする遺伝子と、該転写因子の発現を担うプロモーター(転写因子発現用プロモーター)とを連結して構築したDNA断片(転写因子発現用DNA断片)を、適当な宿主細胞に導入する工程である。当該工程によって、後述するウイルスベクター発現用プロモーターの転写誘導を行う転写因子を安定的に高発現する形質転換体(細胞)の生産(作出)を行う。すなわち宿主細胞の転写因子の発現に最適な染色体上の位置に、該転写因子をコードする遺伝子が組み込まれた形質転換体(細胞)候補を生産(作出)する工程である。

[0190] 上述のごとく、現時点では転写因子発現用DNA断片を宿主細胞に導入する場合、染色体上のどの位置に組み込まれるかを制御することは困難である。よって転写因子発現用DNAが宿主細胞に導入された形質転換体(細胞)であっても、該転写因子の発現に好適な染色体上の位置に組み込まれる場合もあれば、好適でない場合もある。その結果、形質転換体間で転写因子の発現量に差が生じてしまう。したがって本工程では、まず転写因子を安定的に高発現する形質転換体(細胞)を生産(作出)することを目的としている。

[0191] <転写因子発現用DNA断片>

次に本第一形質転換工程で使用する転写因子発現用DNA断片について説明する。転写因子発現用DNA断片は、転写因子発現用プロモーターの下流に転写因子をコードする遺伝子が連結されている。またこの他、ベクター配列、ターミネーター、薬剤耐性マーカー等のDNAセグメントが含まれていてもよい。かかる転写因子発現用DNA断片の構築方法は、通常の遺伝子工学的手法を用いて行えばよい。

[0192] ここで転写因子発現用プロモーターは、転写因子を発現することが可能なものであれば特に限定されるものではなく、また恒常的にプロモーター活性を有するもの(以下、恒常的プロモーターと称する)であってもよいし、さらに転写因子によってプロモーター活性が誘導されるものであってもよい。ただし、転写因子の発現をさらに別の転写因子で制御することは、タンパク質の発現系自体が複雑化すること、コスト面で不利等の理由により、上記転写発現用プロモーターとしては、恒常的プロモーターの方がより好ましいといえる。恒常的プロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、PG10-90(Ishige, F., Takaichi, M., Foster, R., Chua, N.

H. and Oeda, K.(1999) A G-box motif(GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants. Plant J. 20, 127-133. 参照)、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター等が挙げられる。

[0193] 一方使用する転写因子は、特に限定されるものではなく、後述する第二形質転換工程において導入するタンパク質発現用DNA断片中に含まれるプロモーターを転写誘導するものを適宜選択して使用すればよい。特に上記転写因子は、ホルモンによって活性化される性質を有するものであることが好ましい。かかるホルモンとしては、エストロジェン、ステロイドホルモン、エクジソン等が挙げられる。かかる転写因子は、ホルモンが存在しない状態においては不活性型でありプロモーターの転写誘導を行うことができないが、ホルモンが存在することによって活性型に変化しプロモーターの転写誘導を行うことができる。この性質を利用すれば目的タンパク質の生産をより綿密に制御できるため、より安全に目的タンパク質の生産を行うことができるといえる。すなわち、タンパク質生産を行う必要がないとき、あるいはタンパク質生産を行ってはいけなるときには、タンパク質生産系にホルモンを添加しなければよい。

[0194] かかるホルモンによって活性化される性質を有する転写因子、および該転写因子によって転写誘導されるプロモーターの組み合わせとしては、例えば、ステロイドホルモンで活性化される転写因子であるGVGと該転写因子によって転写誘導されるプロモーターである6xUASgal4の組み合わせ、エストロジェンで活性化される転写因子LexA-VP16-hERと該転写因子によって転写誘導可能なプロモーターであるOLExA-46(Zuo J, Niu QW, Chua NH. "An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants." Plant J.2000, 24: 265-273 参照)の組み合わせ、エクジソンで活性化される転写因子であるエクジソンレセプターGR Act and DBDとヘルペスウイルストランスアクチベーションドメインHecR LBDのキメラタンパク質と該転写因子によって転写誘導可能なプロモーターGREの組み合わせ等が挙げられる。ただし、タンパク質生産用の宿主として植物体および植物細胞を利用する場合においては、活性化に用いるホルモンによる宿主への悪影響が少ないという理由からエストロジェンで活性化される転写因子LexA-VP16-hERと該転写因子によって転写誘導可能なプロモーターであるO_{LexA}-46の組み合

わせが好ましいといえる。なお、上述した転写誘導可能なプロモーター等のように、従来公知の転写誘導可能なプロモーターと転写因子の組み合わせを好適に利用できることはいうまでもない。

[0195] 図8(a)に転写因子発現用DNAの一例を示す。図8(a)は、形質転換用ベクターであるTiプラスミドpER8(−Stu)の一部を示している。同図中左から転写因子発現用の恒常的プロモーターP_{G10-90}、その下流にエストロジェンレセプターを含む融合転写因子LexA-VP16-hER、その3'末端にターミネーター配列T_{B9}、またその下流に薬剤耐性マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子Hyg^rがある。

[0196] <転写因子発現用DNA断片を導入する宿主細胞およびDNA断片導入方法>

上記転写因子発現用DNA断片が導入される宿主細胞は特に限定されるものではなく、動物由来細胞であっても植物由来細胞であってもよい。ただし、植物由来細胞は、動物由来細胞に比して、増殖速度が速くコンタミネーションのリスクが少ない点、培地作成費用が非常に安価であるという点において、植物由来細胞がより好ましい。なお、動物由来細胞および植物由来細胞とは、細胞、組織、並びに器官も含む意味である。特に液体培地等で培養可能な細胞(培養細胞)が好ましい。

[0197] また由来となる動物としては、特に限定されるものではないが、ヒト、サル、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、チャイニーズハムスター、ウシ、ウマ、ブタ、メダカやゼブラフィッシュ等の魚類、カイコ、夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)等が挙げられる。一方由来となる植物としては、特に限定されるものではないが、イネ、シロイナズナ、オオムギ、コムギ、タバコ、トマト、キュウリ、ダイズ、ジャガイモ、トウモロコシ、ニチニチソウ、シロイヌナズナ、アルファルファが挙げられる。その他、枯草菌や乳酸菌などの菌類、酵母など単細胞生物が宿主細胞として利用できる。

[0198] また動物由来細胞の例としては特に限定されるものではないが、HeLa細胞、CHO細胞、メラノーマ細胞、マウス3T3細胞が挙げられる。また植物由来細胞の例としては、タバコBY2細胞、ジャガイモ由来、イネ由来、サツマイモ由来、ダイズ由来、パセリ由来、シロイヌナズナ由来、コムギ由来、トウモロコシ由来細胞、ニチニチソウ由来細胞が挙げられる。

[0199] 後述する実施例において、タバコBY2細胞を宿主として用いている。

[0200] また、転写因子発現用DNA断片を宿主細胞へ導入する形質転換方法は特に限定されるものではなく、宿主細胞の種類に応じた適切な形質転換方法を用いればよい。例えば、特別なベクター配列を有しないDNA断片を導入する場合には、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム法等を用いることができる。また植物由来細胞への一般的な形質転換法としては、アグロバクテリウムを用いた形質転換法(アグロバクテリウム法)を挙げることができ、本発明でもアグロバクテリウム法を好適に用いることができる。ただしアグロバクテリウム法を用いて形質転換する場合には、本発明にかかるDNA断片を含むTiプラスミドを構築する必要がある。またその他プロトプラスト/スフェロプラスト法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

[0201] ただし転写因子発現用DNA断片は、宿主細胞のゲノムに組み込まれることが好ましい。転写因子発現用DNA断片がゲノムに組み込まれることにより、細胞分裂後の娘細胞にもベクターの構成に含まれる遺伝子を確実に伝達することが可能となり、転写因子(タンパク質)の生産効率を維持することが可能となるからである。ゲノムは染色体(核ゲノム)に限定されるものではなく、ミトコンドリアゲノムや葉緑体ゲノムも含まれる。

[0202] また転写因子発現用DNA断片が宿主細胞に導入されたか否かを確認する方法は、特に限定されるものではなく、公知の各種の方法を用いることができる。具体的には、各種マーカーを用いればよい。例えば、宿主細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと組み換え植物ウイルス遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。例えば後述する実施例においては、薬剤耐性マーカー(ハイグロマイシン耐性遺伝子、Hyg^r)を用いており、ハイグロマイシンを含有する培地中で、形質転換候補株を培養することにより、生育してきた細胞株を形質転換体として選抜することが可能となる。その他のマーカーとしては、ピアラホス耐性マーカー、カナマイシン耐性マーカー等が植物細胞の選抜に有効であり、ピューロマイシン耐性マーカー、ブレオマイシン耐性マーカー、XGPRT遺伝子、DHFR遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子等が動物細胞の選抜には有効である。さらに

酵母などでは、ウラシル要求性マーカーをはじめとする栄養要求性マーカーを選抜に用いることができる。但しこれら形質転換体の選抜方法は、限定されるものではなく、発現ベクターを導入する宿主等に応じて適宜選択して用いればよい。その他、宿主細胞から調製したゲノムDNAを鋳型とし、導入したタンパク質(転写因子)の遺伝子全長を特異的に増幅するいわゆるジェノミックPCR法を挙げることができる。この方法によって、目的タンパク質(転写因子)をコードする遺伝子が増幅されてくることを電気泳動法等によって確認できれば、該遺伝子の導入を確認することができる。

[0203] (H-2)選抜工程

本形質転換体の生産方法における第2工程として、当該選抜工程がある。当該選抜工程では、上記第一形質転換工程によって得られた形質転換体(細胞)の中から前記転写因子を安定的に高発現する形質転換体(細胞)の選抜を行う。すなわち転写因子の発現に最適な宿主細胞の染色体上の位置に、該転写因子をコードする遺伝子が組み込まれた形質転換体(細胞)を選抜(スクリーニング)する工程である。

[0204] 当該選抜工程における具体的選抜方法は上記第一形質転換工程で得られた形質転換体(細胞)の中から目的とする転写因子を安定的に高発現する形質転換体を選抜する方法であれば特に限定されるものではない。

[0205] 例えば、形質転換体(細胞)から発現タンパク質を抽出し、該転写因子特異抗体を用いてその発現量を検出する方法として、ウエスタンブロット法、エライザ法、ドットブロット法等が適用可能である。また、形質転換体(細胞)から発現RNAを抽出し、該転写因子の遺伝子配列に相補的なプローブを用いて転写因子のmRNAの発現量を検出する方法として、例えばノーザンブロット法、ドットブロット法等が適用可能である。さらに、例えばRT-PCR法、リアルタイムPCR法、マイクロアレイ法等によって該転写因子mRNAの発現量を検出することも可能である。

[0206] (H-3)第二形質転換工程

当該第二形質転換工程は、上記選抜工程により選抜された転写因子を高発現する形質転換体(細胞)(以下転写因子高発現形質転換体(細胞)と称する)に、RNAを遺伝子とするウイルスに任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAと、上記転写因子高発現形質転換体が発現する転写因子で転写誘導

される転写誘導型プロモーターとが連結されてなるタンパク質発現用DNA断片を導入する工程である。あらかじめ転写因子を高発現する形質転換体に、目的とするタンパク質をコードする遺伝子が挿入されたウイルスベクターのcDNAを導入することにより、より高確率に目的タンパク質を高生産する形質転換体(細胞)を生産することができる。

[0207] <タンパク質発現用DNA断片>

本タンパク質発現用DNA断片は、形質転換体(細胞)に任意のタンパク質を生産させるために使用するDNA断片であり、少なくともRNAを遺伝子とするウイルスに任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAと、上記転写因子高発現形質転換体(細胞)が発現する転写因子で転写誘導される転写誘導型プロモーターとからなる。この他、任意のタンパク質をコードする遺伝子挿入用のクローニングサイト(好ましくはマルチクローニングサイト)・ベクター配列・ターミネーター・薬剤耐性マーカー等のDNAセグメントが含まれていてもよい。かかる転写因子発現用DNA断片の調製方法は、通常の遺伝子工学的手法を用いて行えばよい。

[0208] 転写誘導型プロモーターは、転写因子高発現形質転換体が生産する転写因子に応じて選択すればよく、その組み合わせの一例については、(H-1)第一形質転換工程の項で述べたとおりである。

[0209] 細胞に生産させる任意のタンパク質は特に限定されるものではなく、外来の有用タンパク質であってもよく、当該植物が本来有するタンパク質であってもよい。例えば、医薬品として利用可能なヒトのタンパク質等が好適である。

[0210] ウイルスベクターとしては、RNAを遺伝子とするウイルス由来のウイルスベクターであれば特に限定されるものではなく、二本鎖RNAウイルス、一本鎖マイナス鎖RNAウイルス、一本鎖プラス鎖RNAウイルス由来のウイルスベクターを用いることができる。中でも細胞内でcDNAから転写されたRNA自体がmRNAとして機能するという理由から、一本鎖プラス鎖RNAを遺伝子とするウイルス由来のウイルスベクターであることが特に好ましい。一本鎖プラス鎖RNAウイルスは、複製能力が高く目的タンパク質の高生産が可能となるためである。

[0211] また、ウイルスベクターは植物ウイルス由来のウイルスベクターに限定されるもので

はなく、動物ウイルス、ファージを含むあらゆるRNAウイルス由来のウイルスベクターを用いることが可能である。しかしながら、植物細胞に任意のタンパク質を生産させる目的で使用する場合には、植物ウイルス由来のウイルスベクターであることが好ましく、中でも植物のサイレンシングを抑制する因子(サプレッサー)を持つウイルス由来のウイルスベクターであることが特に好ましい。サイレンシングのサプレッサーを持つウイルスベクターを用いることにより、増幅の後半においてもmRNAが分解される現象が生じない。サイレンシングのサプレッサーを持つ植物ウイルスとしては、上述したものが挙げられる。

[0212] また上記ウイルスベクターのcDNAの3'末端には、リボザイム配列が結合していることが好ましい。形質転換体の細胞内でcDNAから転写されるウイルスRNAの3'末端に付加されウイルスの複製能力低下の原因となるターミネーター由来の配列やポリA配列を切断することができるからである。その結果ウイルスの複製能力の低下を防止することができ、目的タンパク質の高生産が可能となる。結合されるリボザイム配列は、上記3'末端に付加された余分な配列を切断できるものであればよく、特に限定されるものではない。例えば、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列(GenBank accession No. X77627他)またはサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列(GenBank accession No. M17439)を用いることができる。

[0213] また任意のタンパク質をコードする遺伝子は、ウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子と置換されていることが特に好ましい。この部位に目的のタンパク質遺伝子を挿入することによりウイルスの外被タンパク質が産生されなくなり、増幅されるウイルス遺伝子は粒子化されず他の植物に感染することがなくなるため、ウイルスの外界への飛散という問題を解消することが可能となる。

[0214] 図8(b)にタンパク質発現用DNA断片の一例を示す。図8(b)は、形質転換用ベクターであるTiプラスミドpBICER8-ToMVerG3(SF3)SRzの一部を示している。同図中左からエストロジェンによって活性化される融合転写因子LexA-VP16-hERによって転写誘導されるプロモーターO_{LexA}-46、その下流にレポーター遺伝子としてGreen Fluorescent Protein 遺伝子(以下GFP遺伝子と称す)を組み込んだトマトモザイクウイルスベクターToMV-GFP cDNA、その3'末端にサテライトタバコリングス

ポットウイルスリボザイム配列S-Rz、さらに35Sターミネーター配列35ST、またその下流に薬剤耐性マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子Kan^rがある。なお、上記タンパク質発現用DNA断片の転写因子高発現形質転換体への導入方法は、(H-1)第一形質転換工程の項で述べた方法と同様に行えばよい。

[0215] 上述のごとく本形質転換体(細胞)の生産方法の最大の特徴点は、同一ベクター上に転写因子発現用DNA断片とタンパク質発現用DNA断片とが挿入されたベクターを用いて宿主細胞を形質転換していた従来法と違い、転写因子発現用DNA断片とタンパク質発現用DNA断片をそれぞれ別個のベクターを用いて宿主細胞に導入していることに有る。本形質転換体の生産方法が上記特徴点を有するメリットは、以下に示すとおりである。(ア)ウイルスベクターおよびタンパク質の発現を制御する(影響を及ぼす)転写因子の発現量を常に一定に保つことができる。従って、転写因子を高発現する形質転換体(細胞)をまず生産(作出)しておき、該形質転換体を用いてさらにタンパク質発現用DNAを導入すれば、ウイルスベクターおよび目的タンパク質を高発現する形質転換体(細胞)を容易に取得することができる。(イ)転写因子の発現量が一定である形質転換体(細胞)に種々ウイルスベクターを含むタンパク質発現用DNA断片を導入することで、ウイルスベクターの発現効率等を比較することができる。それゆえ、ウイルスベクターの改良等を容易に行うことができる。

[0216] 上記本形質転換体(細胞)の生産方法によれば、転写因子をコードする遺伝子およびウイルスベクターをコードする遺伝子の両者が、それぞれ発現に最適な染色体上の位置に組み込まれた形質転換体(細胞)を高確率に取得することが可能となる。

[0217] (I) 本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体およびその利用

本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体(以下本形質転換体)は、上記本形質転換体の生産方法によって生産されたタンパク質生産用形質転換体(細胞)である。本形質転換体は、転写因子をコードする遺伝子およびウイルスベクターをコードする遺伝子の両者が、それぞれ発現に最適な染色体上の位置に組み込まれた形質転換体であるため、本形質転換体を用いることによって、目的タンパク質を高生産することができるものといえる。

[0218] また本発明にかかるタンパク質の生産方法(以下本タンパク質の生産方法)は、上

記本形質転換体を用いることを特徴としている。すなわち、本タンパク質の生産方法は、目的タンパク質をコードする遺伝子が導入された本形質転換体から目的タンパク質を回収することにより行う。さらに目的タンパク質をより大量に取得するためには、本形質転換体の数を培養・栽培・育成等によって増加させ、増加させた本形質転換体から目的タンパク質を回収することにより行うことが好ましい。本形質転換体の培養・栽培・育成条件等は特に限定されるものではなく、本形質転換体に好適な条件を適宜選択して用いればよい。植物由来培養細胞を培養する際の培地としては特に限定されるものではないが、無機塩類、炭素源、ビタミン類、アミノ酸が加えられている場合がある。さらに、ココナツミルクや酵母エキスを加えて成長を促進させる場合がある。その他、オーキシシンとサイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン等の植物ホルモンを添加する場合がある。また培養条件であるが、光、温度、通気の有無等を培養する細胞に応じて最適なものを採用すればよい。例えば、タバコBY2細胞を培養条件の一例としては、370mg/lリン酸二水素カリウム、1mg/lチアミン塩酸、3%スクロース、0.2mg/l 2, 4-Dを含むMS培地を用い、暗所、26℃、135回転/分で巡回振盪培養後、1/100量を一週間ごとに継代することが挙げられる。

[0219] また、本形質転換体の種類としては特に限定されるものではなく、植物・動物の個体であっても、植物・動物由来培養細胞であってもよい。ただし、迅速に大量にタンパク質を生産するためには、形質転換体は培養可能な細胞(培養細胞)であることが好ましい。さらには、細胞の取り扱いのしやすさ・培地が安価である等の理由から、植物由来培養細胞であることが好ましい。上記植物由来培養細胞としては、例えばタバコ由来BY2細胞が挙げられる。なお、植物由来培養細胞を本発明にかかるタンパク質の生産方法に用いることの利点、特に植物個体を用いる場合との比較における利点は、上述した(a)～(k)のとおりである。

[0220] (j) 本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産キット

本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産キット(以下、本キットと称する)は、上記本形質転換体の生産方法を行うためのキットである。本キットを構成するものについては特に限定されるものではないが、転写因子をコードする遺伝子と転写因子発現用プロモーターとが連結されてなる転写因子発現用DNA断片、および／

またはRNAを遺伝子とするウイルスに任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAと、上記転写因子で転写誘導される転写誘導型プロモーターとが連結されてなるタンパク質発現用DNA断片により構成されていることが好ましい。具体的には本キットが、転写因子発現用DNA断片の一例であるpER8(-Stu)、および／またはタンパク質発現用DNA断片の一例であるpBICER8-ToMVerG3(SF3)SRzにより構成されている例が挙げられる。

[0221] 本キットの利用者は、(a)転写因子発現用DNA断片を適当な宿主細胞に導入する工程、(b)その形質転換体の中から転写因子を高発現する形質転換体を選抜する工程、(c)該形質転換体に目的タンパク質をコードする遺伝子が挿入されているタンパク質発現用DNA断片を導入する工程を経てタンパク質生産用形質転換体を得られることとなる。なお本キットに含まれる転写因子発現用DNA断片に目的タンパク質をコードする遺伝子を挿入する方法は、遺伝子工学的手法により行えばよい。

[0222] さらに本キットは、上記転写因子高発現形質転換体および／またはタンパク質発現用DNA断片により構成されていることが好ましい。より具体的には後述する実施例において取得した転写因子高発現形質転換体の一例である転写因子高発現タバコBY2細胞ER8-20、および／またはタンパク質発現用DNA断片の一例であるpBICER8-ToMVerG3(SF3)SRzにより構成されている例が挙げられる。

[0223] 転写因子高発現形質転換体が既に取得されているため、本キットの利用者は(c)のみを行えばよく、より迅速かつ簡便にタンパク質生産用形質転換体を得ることができる。

[0224] この他本キットには、例えば、細胞、培地、制限酵素、修飾酵素類、転写誘導用化学物質(ステロイドホルモン、エストロゲン等)、培養フラスコ、アグロバクテリウム(植物細胞の場合)等が含まれていてもよい。

[0225] [実施例]

以下本発明を実施例および図1〜4に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0226] [実施例1]:タバコBY-2細胞におけるステロイドホルモンによるタンパク質の誘導発現

<発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)の構築>

ウイルスベクターとして、外被タンパク質遺伝子をGFP遺伝子に置換したToMV変異体(ToMV-erG3(SF3))を用いた。なお、該ToMV-erG3(SF3)は、飯 哲夫博士(京都大学大学院)より分譲された。

[0227] 一方形質転換用ベクターとして、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターと転写因子(GVG)を持つTiプラスミドpTA7001(Stu)を用いた。該ベクターは、pTA7001の転写開始点に、PCR法を用いてStuIサイトを導入して作成した。なお該pTA7001は、Chua博士(Laboratory of Plant Molecular Biology, The Rockefeller University)より分譲された。

[0228] 次に、ToMV-erG3(SF3)のcDNAをpTA7001(Stu)のステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターの下流に導入し、発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)を構築した。該ベクターの構築を、さらに詳しく説示すれば、以下のとおりとなる。ToMV変異体のcDNAを含むpiL.erG3(SF3)(Atsushi Tamai and Tetsuo Meshi, "Tobamoviral movement protein transiently expressed in a single epidermal cell functions beyond multiple plasmodesmata and spreads multicellularly in an infection-coupled manner" Molecular Plant-Microbe interaction (2001) 14: 126-134 参照)からリンカーを用いてMluIサイトをAvrIIサイトに置換したプラスミドpiL.erG3(SF3)(Avr)を作成した。さらに、piL.erG3(SF3)を鋳型とし、PCR法を用いて5'末端にSnaBIサイトを導入したToMV cDNA 5'末端約1600塩基対のDNA断片を、SnaBIおよびSpeIで切断した。この操作により得られた約1220塩基対のDNA断片を、pTA7001(Stu)のStuIサイトとSpeIサイトの間に挿入し、プラスミドpTA7001-ToMV5'-Speを作成した。pTA7001-ToMV5'-SpeをSpeIおよびAvrIIで切断した後、ToMV変異体cDNAの3'末端部分を含む約5200塩基対の断片を、pTA7001-ToMV5'-SpeのSpeIサイトに挿入し、発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)を作成した。

[0229] 図1に構築した発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)を示した。

[0230] <タバコBY-2細胞の形質転換>

前記発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)を、タバコBY-2細胞にアグロバクテ

リウム法によって導入した。具体的には、以下に示すとおりにした。

- [0231] 発現ベクターを、エレクトロポレーション法によって *Agrobacterium tumefaciens* EHA105系統に導入した。これをカナマイシン (50mg/l) を含む AB sucrose 培地で前培養を行った。次にタバコ BY-2 細胞と混合してシャーレに移し、26℃、暗所で 42〜48 時間静置してタバコ BY-2 細胞を形質転換した。タバコ BY-2 細胞用培地にて洗浄した後、カルベニシリン (100mg/l) およびハイグロマイシン (20mg/l) を含むタバコ BY-2 細胞用固形培地に広げ、形質転換タバコ BY-2 細胞を増殖させた。

- [0232] <ステロイドホルモンによる転写誘導>

取得した形質転換タバコ BY-2 細胞に対してステロイドホルモン処理 (以下適宜 DEX 処理と称する) による転写誘導を行った。具体的には、形質転換タバコ BY-2 細胞の培養液に、ステロイドホルモン (デキサメタゾン) を 30 μ M になるように加えて行った。

- [0233] 転写誘導の結果は、実体型蛍光顕微鏡装置 (オリンパス社製) を用いて 48 時間後に GFP 蛍光を観察した。また、転写誘導の 48 時間後のトータル RNA を、トライゾル法にて抽出し、ノーザン解析に用いた。ノーザン解析には、ToMV の 3' 非翻訳領域約 200 塩基に相補的な RNA プローブを用いた。プローブのラベリングには、ロシュ・ディアグノスティック社の DIG RNA Labelling Kit を用いて行った。検出には、同社の DIG Luminescent Detection Kit、および CDP-Star を用い、それぞれキットのマニュアルにしたがって行った。

- [0234] 図 2 に、DEX 処理の有無における GFP 遺伝子の mRNA の転写を、ノーザン解析により調べた結果を示す。図 2 より明らかなように、DEX 処理による GFP 遺伝子の mRNA の転写誘導が確認できた。

- [0235] 図 3 に、DEX 処理後の形質転換タバコ BY-2 細胞の蛍光顕微鏡観察結果を示した。GFP による蛍光を検出した結果、図 3 に示すごとく、DEX 処理による GFP の誘導発現が確認できた。

- [0236] <タバコ BY-2 細胞の前培養条件の検討>

継代培養後 DEX 処理までの前培養日数と GFP の発現率を調べた。方法は以下のようにして行った。

[0237] 形質転換細胞を1/100量継代し、3日、5日および7日間前培養をした。そこにステロイドホルモン(デキサメタゾン)を30 μ Mになるように加え、さらに48時間培養した後、ニコン社の正立型蛍光顕微鏡装置で細胞を観察した。GFP蛍光が認められる細胞と認められない細胞をそれぞれ計数し、発現率を算出した。

[0238] 図4に前培養日数と、GFPの発現率との関係を調べた結果を示した。その結果、5日間前培養した場合のGFPの発現率が、約4%と最も高い値を示した。このことは、増殖にともなう細胞の生理状態の変化が、ウイルス配列の複製およびGFPの発現に影響しているためと考えられる

以上説示したごとく、ステロイドホルモンで転写誘導をすることができるプロモーターの下流に、外被タンパク質遺伝子をGFP遺伝子に置換した組み換えToMVのcDNAを導入して構築した発現ベクターを、タバコBY-2細胞に導入した形質転換タバコBY-2細胞について、ステロイドホルモンによる転写誘導を行った結果、確かなウイルスRNAの増幅、GFPの誘導発現ができた。よって、本発明にかかる形質転換細胞、本発明にかかるタンパク質生産方法、および本発明にかかるタンパク質の生産キットを用いることによって、大規模生産能力および高い生産効率を有し、さらに安全性の高いタンパク質の生産が行えるということがいえる。

[0239] 続いて、本発明に係るDNA断片についての実施例を説明する。

[0240] [実施例2]

[使用ベクター]

本実施例においては、発現させるタンパク質を緑色蛍光タンパク質(以下GFPと略記する。)とし、GFPをコードする遺伝子(以下GFP遺伝子と記載する。)を挿入したToMVベクターを含むベクターを使用した。図5(A)に肝炎デルタウイルスのリボザイム配列を付加したベクターの模式図を示し、図5(B)にサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を付加したベクターの模式図を示した。ベクターの構築に用いたリボザイム配列(DNA配列)については、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列を配列番号1に、サテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を配列番号2に示した。配列番号1に示した配列は、肝炎デルタウイルスのゲノム配列(GenBank accession No. X77627他)のアンチゲノミックリボザイム配列に基づいて改

変じたものであり、配列番号2に示した配列は、サテライトタバコリングスポットウイルスのゲノム配列 (GenBank accession No. M17439) のリボザイム配列に基づいて改変したものである。リボザイム配列はいずれもToMVベクターのcDNAの3'末端に連結した。リボザイム配列以外の構成はいずれのベクターも同一である。図5(A)中、H-Rzは肝炎デルタウイルスのリボザイム配列を表し、図5(B)中、S-Rzはサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を表す。図5(A)および図5(B)に共通して、6XUASgal4はステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーター、ToMV-GFP cDNAはGFP遺伝子を挿入したトマトモザイクウイルスのcDNA、3AはエンドウrbcS-3Aポリアデニル化配列、Hygrはハイグロマイシン耐性遺伝子、E9はエンドウrbc-E9ポリアデニル化配列、GVGはステロイドホルモンで活性化される転写因子、P35Sはカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、ハサミの印はリボザイムにより切断される位置をそれぞれ表す。

[0241] 上記ベクターのToMV-GFP cDNA部分には、ToMVの外被タンパク質遺伝子をGFP遺伝子で置換したToMVの変異体のcDNAを用いた。なお、このToMV変異体は30Kタンパク質に変異を持つため、細胞間移行することができない。形質転換用ベクターにはステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーター (6XUASgal4) と転写因子 (GVG) を持つTiプラスミドpTA7001(Stu) (Laboratory of Plant Molecular Biology, The Rockefeller University, Chua博士より供与を受けた) を用いた。pTA7001(Stu)の6XUASgal4プロモーターの下流に上記ToMV変異体のcDNAを導入し、さらにその3'末端に各リボザイム配列を導入して、図5(A)および図5(B)に示したベクターを作製した。

[0242] 図5(A)に示した塩基配列 (配列番号3) は、ToMV-GFP cDNAとH-Rzとの結合遺伝子から転写されたRNAの一部 (ToMV-GFP cDNAの3'末端の6塩基およびH-Rzの5'末端の18塩基) である。図5(A)にハサミの印で示したように、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列の場合は、ToMV-GFP cDNAから転写されたウイルスRNAの3'末端の位置で切断され、余分な配列は付加されないと予想される。図5(B)に示した塩基配列 (配列番号4) は、ToMV-GFP cDNAとS-Rzとの結合遺伝子から転写されたRNAの一部 (ToMV-GFP cDNAの3'末端の6塩基およびS-Rzの5'末端の15塩基) で

ある。図5(B)にハサミの印で示したように、サテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列の場合は、ToMV-GFP cDNAから転写されたウイルスRNAの3'末端にgucの3塩基が付加した位置で切断されると予想される。

[0243] なお、コントロールベクターとしてリボザイム配列を持たないベクター、すなわち図5(A)からH-Rz部分のみを除いたベクター(図5(B)からS-Rz部分のみを除いたベクターでも同じ)を使用した。

[0244] [実験方法]

図5(A)に示したベクターおよび図5(B)に示したベクターをタバコ培養細胞であるBY2細胞にアグロバクテリウム法を用いて導入した。すなわち、図5(A)に示したベクターおよび図5(B)に示したベクターをそれぞれエレクトロポレーション法によって *Agrobacterium tumefaciens* EHA105系統に導入した。これをカナマイシン(50mg/L)を含むAB sucrose培地で前培養を行った。次にBY2細胞と混合してシャーレに移し、26℃、暗所で42〜48時間静置してBY2細胞を形質転換した。BY2細胞用培地に洗浄した後、カルベニシリン(100mg/L)およびハイグロマイシン(20mg/L)を含むBY2細胞用固形培地に広げ、形質転換BY2細胞を増殖させた。その結果、約100個の抗生物質耐性カルス(形質転換カルス)を得た。同様にコントロールベクターをBY2細胞に導入し、約50個の形質転換カルスを得た。得られたカルスを液体培養することにより、形質転換BY2細胞を得た。なお、BY2細胞の培養には、370mg/Lリン酸二水素カリウム、1mg/Lチアミン塩酸、3%スクロース、0.2mg/L 2,4-Dを含むMS液体培地を用いた。培養は、暗所、26℃、135回転/分で旋回振盪培養し、一週間ごとに1/100量を継代した。転写誘導は定常期の細胞培養液を30 μ Mのデキサメタゾンを含む液体培地に、その1/20量になるように移すことによって行った。誘導48時間後に実体型蛍光顕微鏡(オリンパス社製)、および正立型蛍光顕微鏡(ニコン社製)を用いてGFP特異的な蛍光を観察した。GFP蛍光が認められる細胞と認められない細胞をそれぞれ計数し、発現率を算出した。

[0245] [結果]

図6(A)、図6(B)および図6(C)に形質転換したBY2細胞におけるGFPの誘導発現を観察した画像を示した。図6(A)はリボザイム配列を付加していないコントロール

ベクターで形質転換したBY2細胞、図6(B)は肝炎デルタウイルスのリボザイム配列を付加したベクターで形質転換したBY2細胞、図6(C)はサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を付加したベクターで形質転換したBY2細胞のGFPの発現をそれぞれ観察した画像である。図6(A)、図6(B)および図6(C)から明らかなように、図6(A)と比較して図6(B)および図6(C)ではGFPを発現している細胞の数が顕著に多くなった。

[0246] 図7にGFPを発現しているBY2細胞の割合を示した。図中の◆はコントロールベクター、■は肝炎デルタウイルスのリボザイム配列を付加したベクター、●はサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を付加したベクターを用いて改質転換したBY2細胞であることを示す。また、前培養の日数とは継代からステロイドホルモン処理をする日までの培養日数を意味する。図7から明らかなように、コントロールベクターを用いた場合は7日目においてもGFPを発現した細胞の割合は5%未満であるのに対して、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列を付加したベクターを用いた場合は約25%、サテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を付加したベクターを用いた場合は約60%であった。

[0247] 以上の結果より、リボザイム配列を付加することでGFPを発現した細胞の割合が大幅に増加することが明らかとなった。

[0248] 次に、本発明に係るタンパク質生産用形質転換体の生産方法、および当該生産方法によって得られたタンパク質生産用形質転換体に関する実施例について説明する。

[0249] [実施例3]:GFP生産用形質転換タバコBY2細胞の生産

[転写因子発現用DNA断片導入用ベクターの構築]

転写因子発現用DNA断片を宿主細胞(タバコBY2細胞)に導入するためのベクター(以下転写因子発現用DNA断片導入用ベクターと称する)として、TiプラスミドpER8(-Stu)を用いた。pER8(-Stu)は、恒常的プロモーターP_{G10-90}の下流にエストロジェンレセプターを含む融合転写因子LexA-VP16-hERをコードする遺伝子、ターミネーターT_{ES}を連結し、さらに薬剤耐性マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子(Hyg^r)を組み込んで構築した。図8(a)にpER8(-Stu)の構造を模式図として示

した。

[0250] [タンパク質発現用DNA断片導入用ベクターの構築]

ToMVの外被タンパク質をコードする遺伝子を、GFPをコードする遺伝子(以下、GFP遺伝子と称する)で置換したToMV変異体を用いた。形質転換用ベクターとしてエストロジェンで転写誘導可能なプロモーターO_{LexA}-46を有するTiプラスミドを用い、O_{LexA}-46の下流にToMV変異体のcDNAを連結し、さらにその3'末端にサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列S-Rz、35Sターミネーター(35ST)、カナマイシン耐性遺伝子(Kan^r)を組み込んだタンパク質発現用DNA断片を宿主細胞(タバコBY2細胞)に導入するためのベクター(以下タンパク質発現用DNA断片導入用ベクターと称する)pBICER8-ToMVerG3(SF3)SRzを構築した。図8(b)に、pBICER8-ToMVerG3(SF3)SRzの構造を模式図として示した。

[0251] [第一形質転換工程:転写因子発現用DNA断片の宿主細胞への導入]

転写因子発現用DNA断片導入用ベクターpER8(-Stu)を、タバコBY2細胞にアグロバクテリウム法により導入した。まずpER8(-Stu)をエレクトロポレーション法によってAgrobacterium tumefaciens EHA105系統に導入した。これをカナマイシン(50 mg/l)を含むAB sucrose培地で前培養した。次にタバコBY2細胞と混合してシャーレに移し、26℃、暗所で42〜48時間静置してタバコBY2細胞を形質転換した。タバコBY2細胞用培地にて洗浄した後、カルベニシリン(100mg/l)およびハイグロマイシン(20mg/l)を含むタバコBY2細胞用固形培地に広げ、形質転換タバコBY2細胞ER8を増殖させた。

[0252] [選抜工程:転写因子高発現形質転換体の選抜]

形質転換タバコBY2細胞ER8のうち、26の細胞ラインをノーザンブロット法に供し、転写因子の発現量の高い3つの細胞ラインを選抜した。ここで「細胞ライン」とは、形質転換細胞を増殖させることにより形成された個々のコロニーから得られた細胞集団のことを意味する。

[0253] [第二形質転換工程:タンパク質発現用DNA断片の導入]

上記で得られた3つの転写因子高発現タバコBY2細胞ライン(ER8-17、ER8-20、ER8-32)各々に、ウイルスベクターpBICER8-ToMVerG3(SF3)SRzをアグ

ロバクテリウム法により導入し形質転換細胞を得た。

[0254] [GFPの誘導発現]

上記で得られた各形質転換細胞を1/100量になるよう継代し、継代培養後7日間前培養した細胞を、エストロジェンの終濃度が0.01mMとなるように加えた培地に1/20量になるように移した。さらに48時間培養した後、実体型蛍光顕微鏡装置(オリンパス社製)および正立型蛍光顕微鏡装置(ニコン社製)で細胞を観察した。

[0255] 結果は、各細胞ラインにおいて、GFP蛍光が認められる細胞と認められない細胞をそれぞれ計数して発現率を算出し、1%以上の細胞でGFP蛍光が認められる細胞ラインをGFPの高発現細胞ラインとした。

[0256] 表1に各転写因子高発現タバコBY2細胞ラインから得られた形質転換細胞について、GFPの高発現細胞ラインの得られる割合を示す。なお表1は、ER8-17、ER8-20、ER8-32のみの結果を示す。

[表1]

| | GFP高発現 細胞ラインの数 | 総細胞ライン数 | GFP高発現 細胞ラインの割合 |
|--------|-------------------|---------|--------------------|
| ER8-20 | 33 | 99 | 33% |
| ER8-17 | 4 | 46 | 9% |
| ER8-32 | 0 | 8 | 0% |

その結果、各転写因子高発現タバコBY2細胞ラインのうち、ER8-20を用いた場合に、GFPの高発現細胞ラインが得られる割合が33%と最も高くなった。

[0257] さらに各転写因子高発現タバコBY2細胞ラインについて、目的タンパク質としてGFPにMPT(movement protein tag)を付加した融合タンパク質を用いたタンパク質発現用DNA断片を導入し、上記と同様にしてGFPの高発現細胞ラインが得られる割合を検討した。

[0258] その結果を表2に示す。なお表2は、ER8-20、ER8-17のみの結果を示す。

[表2]

| | GFP高発現 細胞ラインの数 | 総細胞ライン数 | GFP高発現 細胞ラインの割合 |
|--------|-------------------|---------|--------------------|
| ER8-20 | 48 | 148 | 32% |
| ER8-17 | 0 | 58 | 0% |

その結果、前実験と同様、ER8-20を用いた場合にGFPの高発現細胞のラインが得られる割合が32%と最も高くなった。よって転写因子高発現タバコBY2細胞ラインER8-20に、タンパク質発現用DNA断片を導入すれば、目的タンパク質を高発現する形質転換細胞を高確率で得られるということがわかった。また目的タンパク質を変更しても同様の結果が得られたことから、転写因子高発現タバコBY2細胞ラインER8-20に対して、種々のタンパク質をコードする遺伝子が挿入された発現用DNA断片を導入しても、目的タンパク質高発現形質転換細胞を高確率に取得することができるといえる。

[0259] 【実施例4】:GFP生産用形質転換タバコBY2細胞を用いたエストロジェンによるGFPの誘導発現

実施例3において、転写因子高発現タバコBY2細胞ラインER8-20を形質転換して取得したGFP高発現細胞(E113株)を用いて、GFPのエストロジェンによる誘導発現を試みた。

[0260] 【方法】

E113株を1/100量になるよう継代し、継代培養後0日間から6日間前培養した。前培養を0日間、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間行ったE113株の培養液に対して、エストロジェンを終濃度0.01mM添加しGFPの誘導発現を行った。

[0261] エストロジェン添加後48時間のE113株から全RNAを抽出し、ノーザンブロット法によりToMVに特異的なRNAを検出した。解析には、ToMVの3'非翻訳領域約200塩基に相補的なRNAプローブを用いた。プローブのラベリングは、ロシュ・ディアグノスティック社のDIG RNA Labeling Kitを用いて行った。検出には、同社のDIG

Luminescent Detection KitおよびCDP-Starを用い、それぞれキットのマニュアルに従って行った。

[0262] また、エストロジェン添加後48時間のE113株から全タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法によりGFPの検出を行った。各レーン5 μ gのタンパク質をロードし、シグナルの検出にはGFP特異抗体を用いた。その他の方法については、ウエスタンブロットの標準法に準じて行った。

[0263] 【結果】

ノーザンブロット法によるToMV特異的RNAの検出結果を図9(a)に示した。図9(a)の左から7レーンは、エストロジェンによる転写誘導を行わなかった場合の結果(エストロジェン(-))を示し、残りの7レーンは、エストロジェンによる転写誘導を行った場合の結果(エストロジェン(+))を示している。図9(a)の結果から、エストロジェンによるToMVの明らかな転写誘導が確認された。特に0日間・1日間・2日間・3日間・4日間前培養した場合において、ToMVに特異的なゲノムRNAおよびサブゲノムGFPメッセンジャーRNAが検出できた。なお、図9(a)下図にリボゾームRNAを検出した結果を示し、リボゾームRNA量に差がないことを確認している。

[0264] 一方図9(b)はウエスタンブロット法によるGFPの検出結果である。図9(b)の左から7レーンは、エストロジェンによる転写誘導を行わなかった場合の結果(エストロジェン(-))を示し、残りの7レーンは、エストロジェンによる転写誘導を行った場合の結果(エストロジェン(+))を示している。また同図中、右端のレーンにGFPの精製標品50ngをマーカーとして示している。図9(b)の結果から、エストロジェンによるGFPの誘導発現が確認された。特に0日間・1日間・2日間・3日間・4日間前培養した場合において、強いGFPシグナルを検出した。この結果は図9(a)のToMV特異的RNAの結果とリンクするものであり、ToMVベクターは単なる遺伝子挿入の手段というよりは、ToMVベクターの増殖およびmRNA増幅の手段であると考えられた。すなわち、図9(a)に示されたToMVベクターRNAの発現および複製、それに伴ったサブゲノムGFPメッセンジャーRNAの発現増加が、図9(b)に示されたGFPの発現量に反映していると考えられる。

[0265] 以上説示したごとく、第一形質転換工程および選抜工程によって転写因子高発現

形質転換体(タバコBY2細胞)を取得(生産)しておき、当該転写因子高発現形質転換体にタンパク質生産用DNA断片を第二形質転換工程により導入すれば、ウイルスベクターを高効率で転写誘導し、目的タンパク質を高生産するタンパク質生産用形質転換体を高効率(高確率)で生産(作出)することができる。したがって、本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産方法、本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体、本発明にかかるタンパク質生産方法、本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産キットによれば、高効率にウイルスベクターを誘導発現できるタンパク質生産用形質転換体を生産する時間、費用、労力が著しく軽減され、有用タンパク質の高生産がより容易になるといえる。

- [0266] 尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであつて、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

産業上の利用の可能性

- [0267] 上記のように本発明にかかる形質転換体は、発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結してなる発現ベクターが、生物由来細胞に導入されていることを特徴とする形質転換細胞という構成である。
- [0268] また同じく本発明にかかるタンパク質の生産方法は、上記本発明にかかる形質転換細胞を用いてなり、好ましくは該細胞の培養工程、およびホルモンによる転写誘導工程により構成されている。
- [0269] また本発明にかかるタンパク質生産キットは、上記本発明にかかるタンパク質生産方法を行うためにキットであり、好ましくは上記発現ベクター、転写誘導を行うためのホルモン、および発現ベクターが導入される宿主となる細胞により構成されている。
- [0270] 上記構成によれば、発現タンパク質をコードする遺伝子のmRNAをウイルスの高い複製能力によって高度に増幅することができる。また該mRNAは、ウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有するウイルスに起因して増幅されているため、宿主細胞のウイルス抵抗性反応によって分解が抑制される。そのため継続的に目的タンパク質を高

生産することができる。さらに発現ベクターが導入された宿主が生物個体でなく生物由来細胞であるため、培養は液体培養で行うことが可能であり、また培養スケールの増大が安価かつ容易である。また、形質転換細胞は、自生することができず、万一該形質転換細胞が外界に漏洩した場合であっても死滅するため安全であるといえる。

[0271] よって、本発明にかかる形質転換細胞、本発明にかかるタンパク質生産方法、および本発明にかかるタンパク質生産キットは、大規模生産能力および高い生産効率を有し、さらに安全性の高いタンパク質の生産が可能となるという効果を奏する。

[0272] このため、本発明によれば、本発明は安価で大量にタンパク質を生産することが可能であり、得られたタンパク質は、医薬、化学工業、食品工業をはじめとする広範な分野に有効に利用できる。さらには、本発明にかかる形質転換細胞に導入された発現ベクター、宿主細胞等をタンパク質発現キットとして市販したりすることができるので、実験・研究用の試薬産業等にも応用することが可能となる。

[0273] また、本発明に係るDNA断片は、任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAとその3'末端に結合したリボザイム配列とを有するため、細胞内でcDNAから転写されるウイルスRNAの3'末端に付加されているターミネーター由来の配列およびポリA配列を、リボザイムを用いて切断することができ、大幅にウイルスRNAの蓄積を増加させることができるという効果を奏する。

[0274] また、植物のサイレンシングを抑制する因子を持つ植物ウイルス由来のウイルスベクターを用いることにより、増幅の後半にmRNAが分解される現象を抑制できるという効果を奏する。さらに転写誘導可能なプロモーターを用いることにより発現を制御することが可能となり、安全性の面で非常に優れた効果を奏する。

[0275] すなわち、本発明に係るDNA断片、ベクター、形質転換体およびタンパク質の生産方法は、植物に任意の有用タンパク質を生産させるため、大規模生産能力、高い生産効率および安全性を併せ持つタンパク質合成系を構築することができるという効果を奏する。

[0276] また、本発明に係る植物細胞形質転換用キットは本発明に係るベクターを含むものであり、任意の有用タンパク質を生産可能な植物を簡易に作製することができるという効果を奏する。

- [0277] それゆえ、生産された有用タンパク質の用途により、医薬品産業や食品産業等に利用可能である。また、広く農業の発展にも大いに貢献できるものである。
- [0278] また、本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産方法によれば、転写因子をコードする遺伝子が該転写因子の発現に最適な染色体上の位置に組み込まれた形質転換体(細胞)、換言すれば転写因子を安定的に高発現する形質転換体(細胞)をあらかじめ選抜することができる。ここで選抜された転写因子を安定的に高発現する形質転換体(細胞)にウイルスベクター遺伝子を導入すれば、転写因子をコードする遺伝子およびウイルスベクターをコードする遺伝子の両者が、それぞれ発現に最適な染色体上の位置に組み込まれた形質転換体(細胞)を高確率に取得することが可能となる。それゆえ、目的タンパク質を高生産することができる形質転換体(細胞)を少ない労力と時間で取得することができるという効果を奏する。
- [0279] また本発明にかかる形質転換体(細胞)、および本発明にかかるタンパク質の生産方法によれば、目的とするタンパク質を高生産することが可能となるという効果を奏する。
- [0280] さらに本発明にかかるタンパク質生産用形質転換体の生産キットによれば、より簡便に目的タンパク質を高生産することができる形質転換体(細胞)を少ない労力と時間で取得することができるという効果を奏する。
- [0281] それゆえ、本発明により、効率よく、かつ、安価、安全に有用タンパク質を大量生産することが可能となり、得られたタンパク質は医薬、化学工業、食品工業をはじめとする広範な分野で有効に利用できる。さらには、本発明にかかる形質転換体に導入されたベクター、宿主細胞等をタンパク質生産キットとして市販することも可能となるので、実験・研究用の試薬産業等にも応用することが可能となる。

請求の範囲

- [1] 発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、
転写誘導可能なプロモーターとを連結してなる発現ベクターと、が、生物由来細胞に導入されていることを特徴とする形質転換細胞。
- [2] 前記植物ウイルスが、トバモウイルス属に属するウイルスであることを特徴とする請求の範囲1に記載の形質転換細胞。
- [3] 前記トバモウイルス属に属するウイルスが、タバコモザイクウイルスまたはトマトモザイクウイルスであることを特徴とする請求の範囲2に記載の形質転換細胞。
- [4] 前記転写誘導可能なプロモーターとは、化学物質により転写誘導されるプロモーターであることを特徴とする請求の範囲1〜3のいずれか1項に記載の形質転換細胞。
- [5] 前記化学物質が、ホルモンであることを特徴とする請求の範囲4に記載の形質転換細胞。
- [6] 前記ホルモンが、ステロイドホルモンであることを特徴とする請求の範囲5に記載の形質転換細胞。
- [7] 前記生物由来細胞が植物由来細胞であることを特徴とする請求の範囲1〜6のいずれか1項に記載の形質転換細胞。
- [8] 請求の範囲7に記載の植物由来細胞が、タバコ由来細胞であることを特徴とする形質転換細胞。
- [9] 請求の範囲8に記載のタバコ由来細胞が、タバコBY-2細胞であることを特徴とする形質転換細胞。
- [10] 上記タンパク質発現用ベクターがアグロバクテリウム法により導入されていることを特徴とする請求の範囲1〜9のいずれか1項に記載の形質転換細胞。
- [11] 請求の範囲1〜10のいずれか1項に記載の形質転換細胞を用いることを特徴とするタンパク質の生産方法。
- [12] 前記タンパク質の生産方法であって、形質転換細胞の培養工程を含むことを特徴とする請求の範囲11に記載のタンパク質の生産方法。
- [13] 前記タンパク質の生産方法であって、さらに化学物質による転写誘導工程を含むこ

- とを特徴とする請求の範囲12に記載のタンパク質の生産方法。
- [14] 前記化学物質による転写誘導工程が、ホルモンによる転写誘導工程であることを特徴とする請求の範囲13に記載のタンパク質の生産方法。
- [15] 前記ホルモンによる転写誘導工程が、ステロイドホルモンによる転写誘導工程であることを特徴とする請求の範囲14に記載のタンパク質の生産方法。
- [16] 請求の範囲11～15のいずれか1項に記載のタンパク質の生産方法を行うためのタンパク質生産キット。
- [17] 前記タンパク質の生産キットであって、請求の範囲1～10のいずれか1項に記載の発現ベクターを含むことを特徴とする請求項16に記載のタンパク質生産キット。
- [18] 前記タンパク質の生産キットであって、さらにホルモンを含むことを特徴とする請求の範囲16または17に記載のタンパク質生産キット。
- [19] 前記ホルモンがステロイドホルモンであることを特徴とする請求の範囲18に記載のタンパク質生産キット。
- [20] 前記タンパク質の生産キットであって、さらに宿主となる生物由来細胞が含まれていること特徴とする請求の範囲16～19のいずれか1項に記載のタンパク質生産キット。
- [21] 前記生物由来細胞が、植物由来細胞であることを特徴とする請求の範囲20に記載のタンパク質生産キット。
- [22] 前記植物由来細胞が、タバコ由来細胞であることを特徴とする請求の範囲21に記載のタンパク質生産キット。
- [23] 前記タバコ由来細胞が、タバコBY-2細胞であることを特徴とする請求の範囲22に記載のタンパク質生産キット。
- [24] 細胞に任意のタンパク質を生産させるために使用するDNA断片であって、
RNAを遺伝子とするウイルスに任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAと、
上記ウイルスベクターのcDNAの3'末端に結合したリボザイム配列とを有することを特徴とするDNA断片。
- [25] 上記ウイルスベクターは、一本鎖プラス鎖RNAを遺伝子とするウイルス由来であることを特徴とする請求の範囲24に記載のDNA断片。

- [26] 上記ウイルスベクターは植物ウイルス由来であることを特徴とする請求の範囲24または25に記載のDNA断片。
- [27] 上記ウイルスベクターは、植物のサイレンシングを抑制する因子を持つ植物ウイルス由来であることを特徴とする請求の範囲26に記載のDNA断片。
- [28] 上記ウイルスベクターは、トバモウイルス属に属するウイルス由来であることを特徴とする請求の範囲27に記載のDNA断片。
- [29] 上記ウイルスベクターは、タバコモザイクウイルスベクターまたはトマトモザイクウイルスベクターであることを特徴とする請求の範囲28に記載のDNA断片。
- [30] 上記リボザイム配列は肝炎デルタウイルスのリボザイム配列またはサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列であることを特徴とする請求の範囲24〜29のいずれか1項に記載のDNA断片。
- [31] 上記任意のタンパク質をコードする遺伝子は、ウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子のプロモーター下流に挿入されることを特徴とする請求の範囲24〜30のいずれか1項に記載のDNA断片。
- [32] 上記任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAおよびその3'末端に結合したリボザイム配列は、それらの上流に配置された転写誘導可能なプロモーターにより転写制御されることを特徴とする請求の範囲24〜31のいずれか1項に記載のDNA断片。
- [33] さらに上記転写誘導可能なプロモーターの転写を制御するための転写因子をコードする遺伝子を有することを特徴とする請求の範囲32に記載のDNA断片。
- [34] 上記転写制御にはステロイドホルモンまたはエストロジェンを用いることを特徴とする請求の範囲33に記載のDNA断片。
- [35] 上記転写制御には、ステロイドホルモンで転写誘導活性化される転写因子としてGVGを用い、活性化されたGVGにより転写誘導されるプロモーターとして6XUASgal4を用いることを特徴とする請求の範囲34に記載のDNA断片。
- [36] 上記転写制御には、エストロジェンで転写誘導活性化される転写因子としてXVEを用い、活性化されたXVEにより転写誘導されるプロモーターとしてO_{LexA}-46を用いることを特徴とする請求の範囲34に記載のDNA断片。

- [37] 請求の範囲24〜36のいずれか1項に記載のDNA断片を含み、かつ細胞のゲノムに組み込まれる性質を有することを特徴とするベクター。
- [38] 上記ベクターはTiプラスミドであることを特徴とする請求の範囲39に記載のベクター。
- [39] 少なくとも請求の範囲24〜36のいずれか1項に記載のDNA断片、あるいは請求の範囲37または38に記載のベクターのいずれかを含むことを特徴とする形質転換用キット。
- [40] 請求の範囲24〜36のいずれか1項に記載のDNA断片、請求の範囲37または38に記載のベクター、請求の範囲39に記載のキットのうち、いずれかを用いることにより得られる形質転換体。
- [41] ウイルスベクターを転写発現する形質転換体であって、任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターの3'末端にリボザイム配列を結合したDNA断片または当該断片を含むベクターを用いて得られる形質転換体。
- [42] トバモイルス属由来のウイルスベクターを転写発現する形質転換体であって、任意のタンパク質コードする遺伝子を挿入したトバモイルス属由来ウイルスベクターの3'末端にリボザイム配列を結合したDNA断片または当該断片を含むベクターを用いて得られる形質転換体。
- [43] 上記形質転換体は植物体または培養細胞であることを特徴とする請求の範囲42に記載の形質転換体。
- [44] ウイルスベクターを転写誘導できる形質転換体であって、任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターの3'末端にリボザイム配列を結合し、かつウイルスベクターを転写誘導可能なDNA断片または当該断片を含むベクターを用いて得られる形質転換体。
- [45] 請求の範囲41〜44のいずれか1項に記載の形質転換体を用いることを特徴とするタンパク質の生産方法。
- [46] 転写因子をコードする遺伝子と転写因子発現用プロモーターとが連結されてなる転写因子発現用DNA断片を宿主細胞に導入する第一形質転換工程と、
前記第一形質転換工程によって得られた形質転換体の中から前記転写因子を発

現する形質転換体を選抜する選抜工程と、

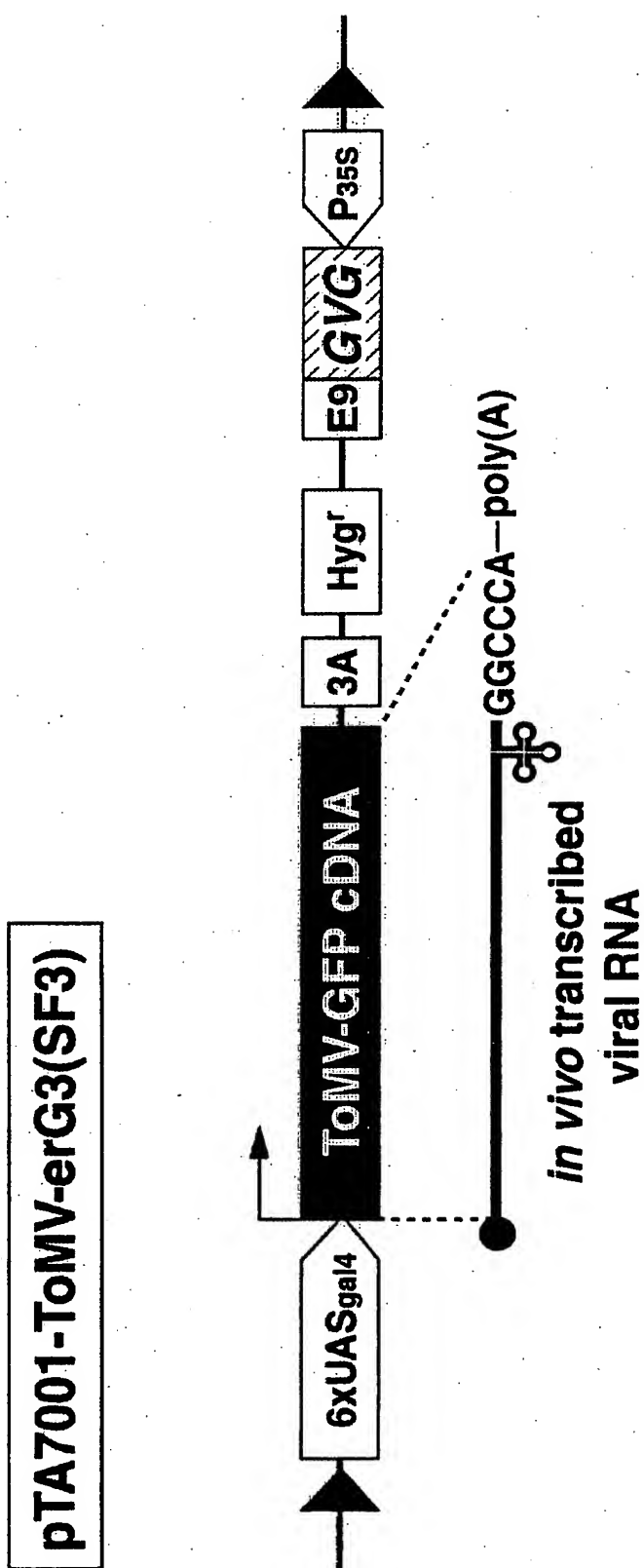
RNAを遺伝子とするウイルスに任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターのcDNAと、上記転写因子で転写誘導される転写誘導型プロモーターとが連結されてなるタンパク質発現用DNA断片を、前記選抜工程によって選抜された形質転換体に導入する第二形質転換工程とからなることを特徴とするタンパク質生産用形質転換体の生産方法。

- [47] 上記転写因子が、ホルモンによって活性化される性質を有することを特徴とする請求の範囲46に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [48] 上記ホルモンが、エストロジェンまたはステロイドホルモンであることを特徴とする請求の範囲47に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [49] 上記エストロジェンで活性化される性質を有する転写因子としてLexA-VP16-hERを用い、上記転写誘導型プロモーターとしてO_{LexA}-46を用いることを特徴とする請求の範囲48に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [50] 上記ウイルスベクターは、一本鎖プラス鎖RNAを遺伝子とするウイルス由来であることを特徴とする請求の範囲46～49のいずれか1項に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [51] 上記ウイルスベクターが、植物ウイルス由来であることを特徴とする請求の範囲50に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [52] 上記ウイルスベクターが、植物のサイレンシングを抑制する因子を持つ植物ウイルス由来であることを特徴とする請求の範囲51に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [53] 上記ウイルスベクターが、トバモウイルス属に属するウイルス由来であることを特徴とする請求の範囲52に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [54] 上記ウイルスベクターが、トマトモザイクウイルスベクターまたはタバコモザイクウイルスベクターであることを特徴とする請求の範囲53に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [55] 上記ウイルスベクターのcDNAの3'末端に、リボザイム配列が結合していることを特徴とする請求の範囲46～54のいずれか1項に記載のタンパク質生産用形質転換

体の生産方法。

- [56] 上記リボザイム配列が、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列、またはサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列であることを特徴とする請求の範囲55に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [57] 上記任意のタンパク質をコードする遺伝子が、上記ウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子と置換されていることを特徴とする請求の範囲46〜56のいずれか1項に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [58] 上記転写因子発現用DNA断片、および上記タンパク質発現用DNA断片が、アグロバクテリウム法により導入されていることを特徴とする請求の範囲46〜57のいずれか1項に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [59] 上記宿主細胞および形質転換体が、植物体または植物由来培養細胞であることを特徴とする請求の範囲46〜58のいずれか1項に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [60] 上記植物由来培養細胞がタバコ由来細胞であることを特徴とする請求の範囲59に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [61] 上記タバコ由来細胞がタバコBY2細胞であることを特徴とする請求の範囲60に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法。
- [62] 請求の範囲46〜61のいずれか1項に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法によって生産されたタンパク質生産用形質転換体。
- [63] 請求の範囲62に記載のタンパク質生産用形質転換体を用いることを特徴とするタンパク質の生産方法。
- [64] 請求の範囲46〜63のいずれか1項に記載のタンパク質生産用形質転換体の生産方法を行うための生産キット。

[図1]



[2]

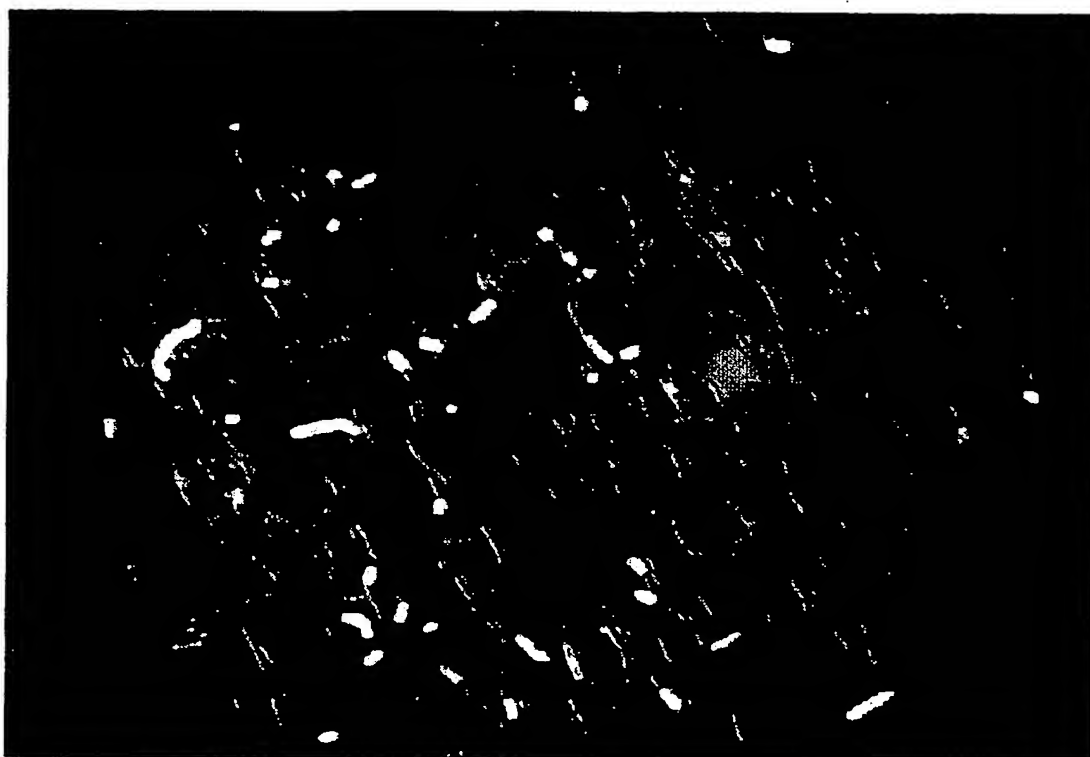
DEX
- +



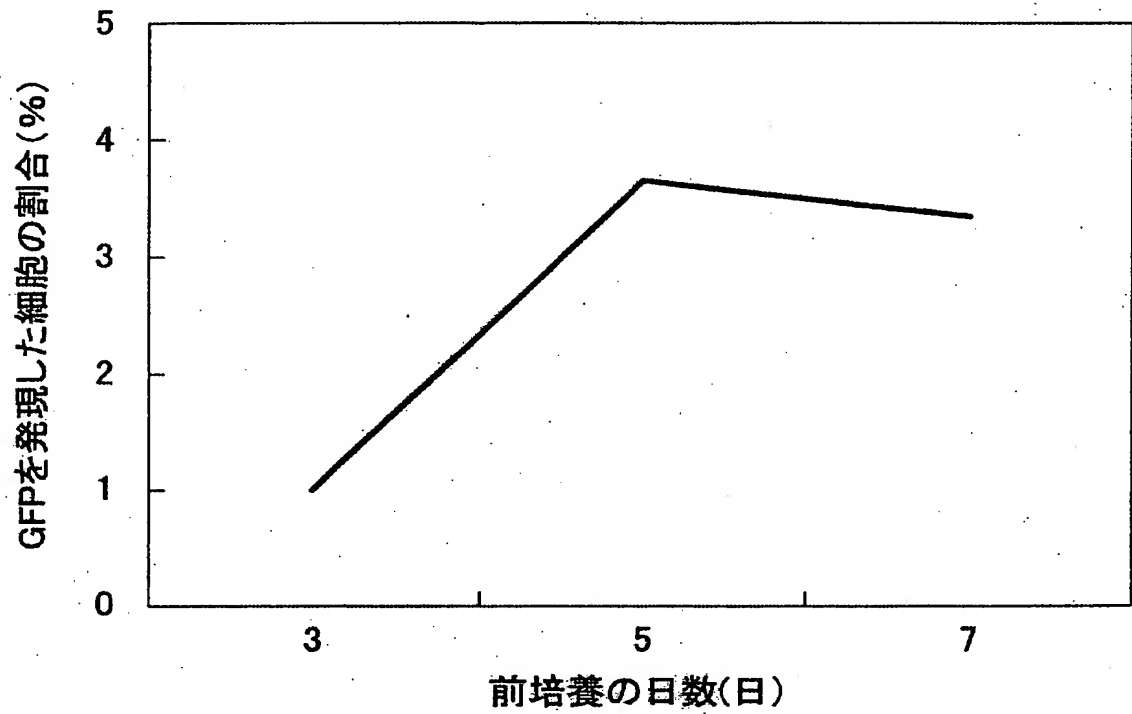
- GFP
mRNA

BEST AVAILABLE COPY

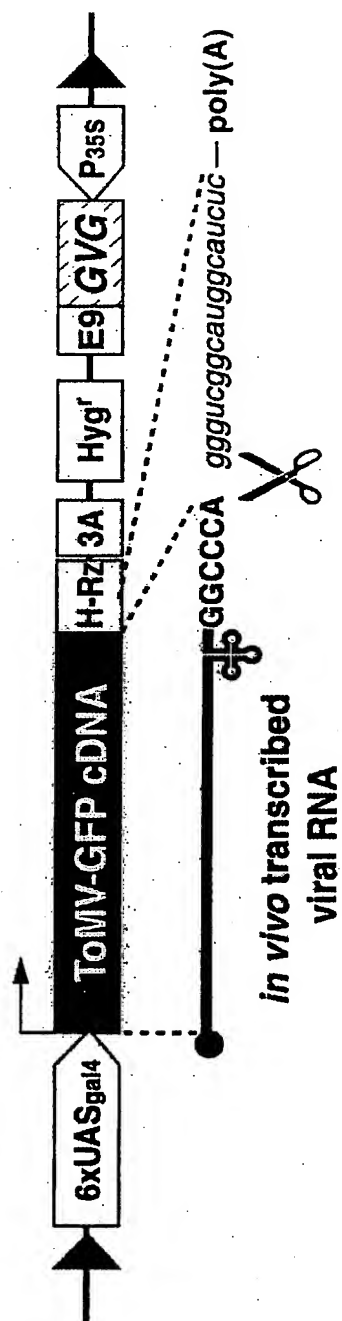
[3]



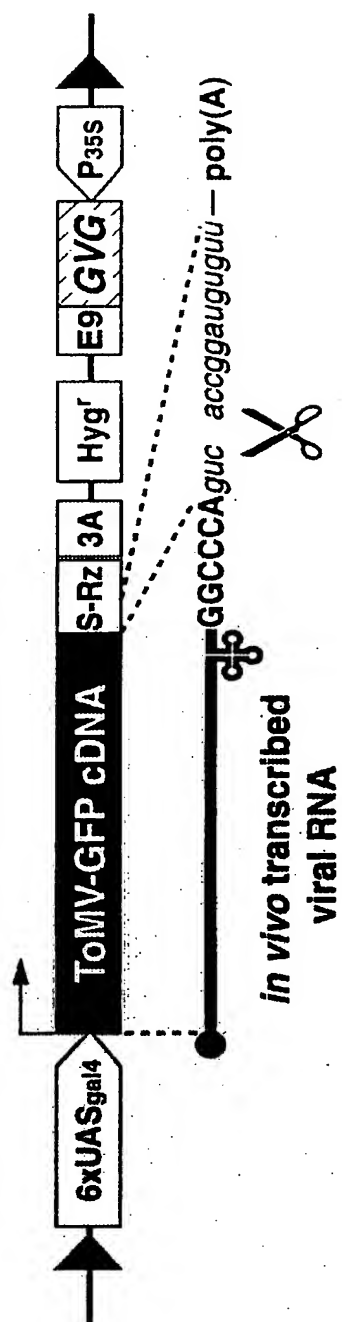
[図4]



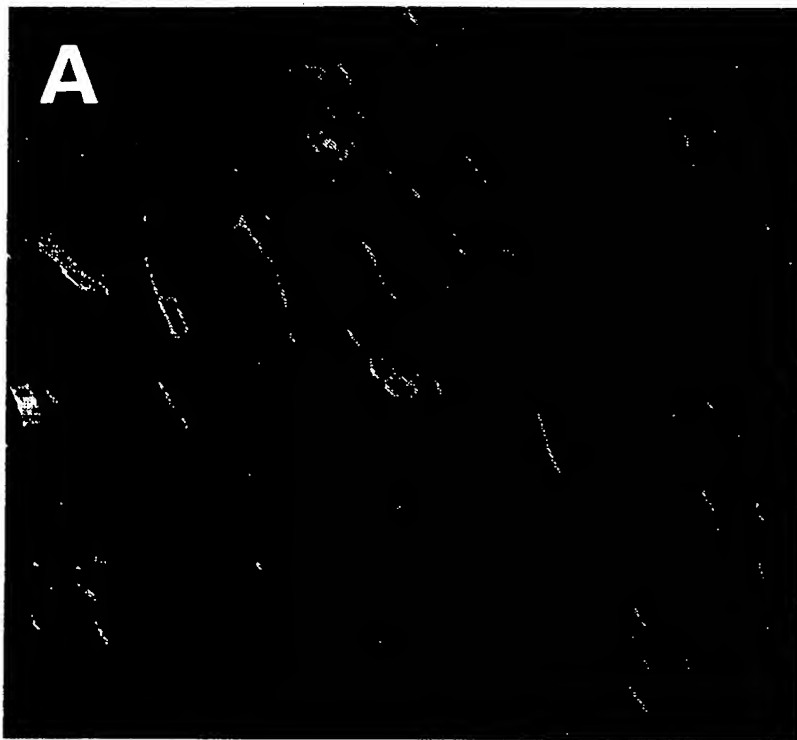
[図5(A)]



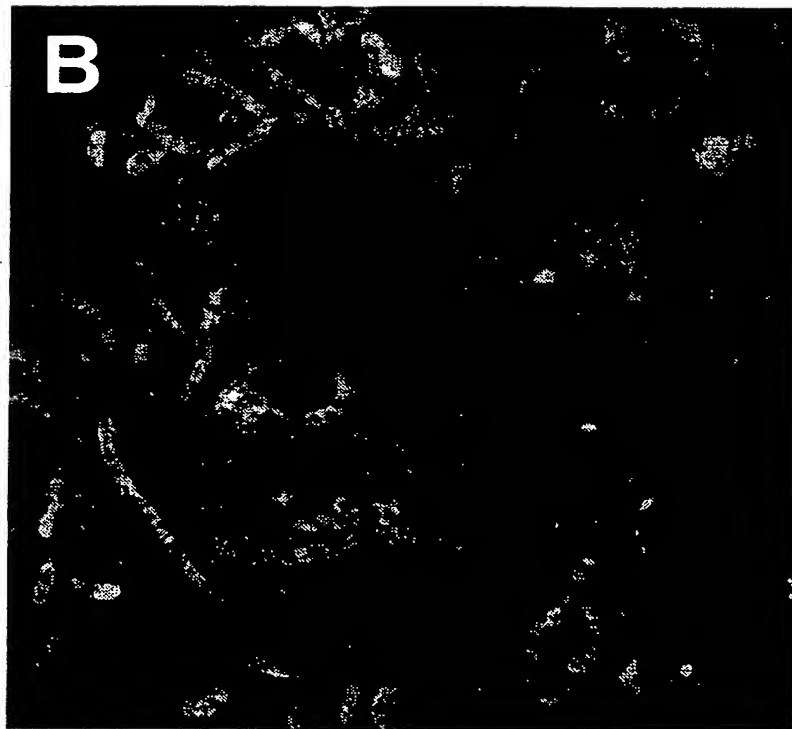
[5(B)]



[図6(A)].

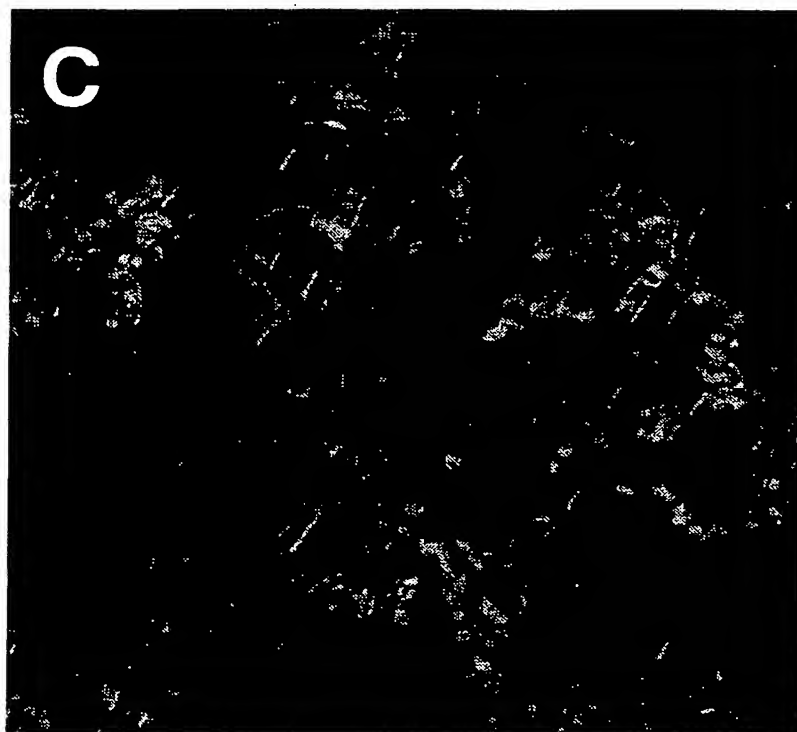


[図6(B)]

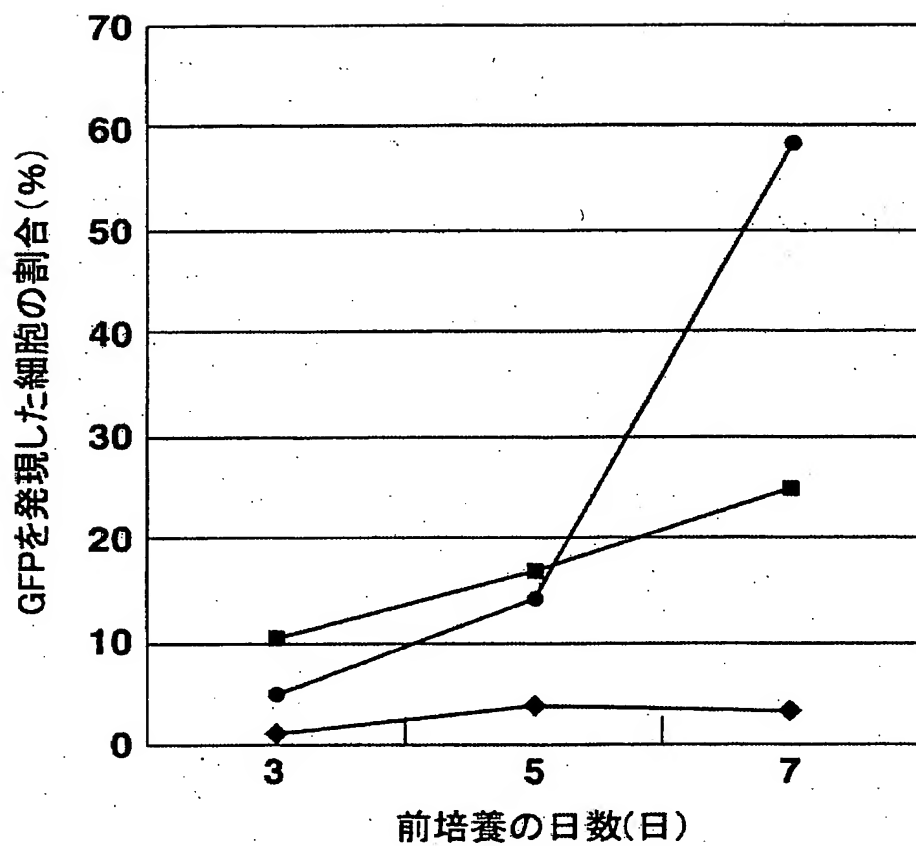


BEST AVAILABLE COPY

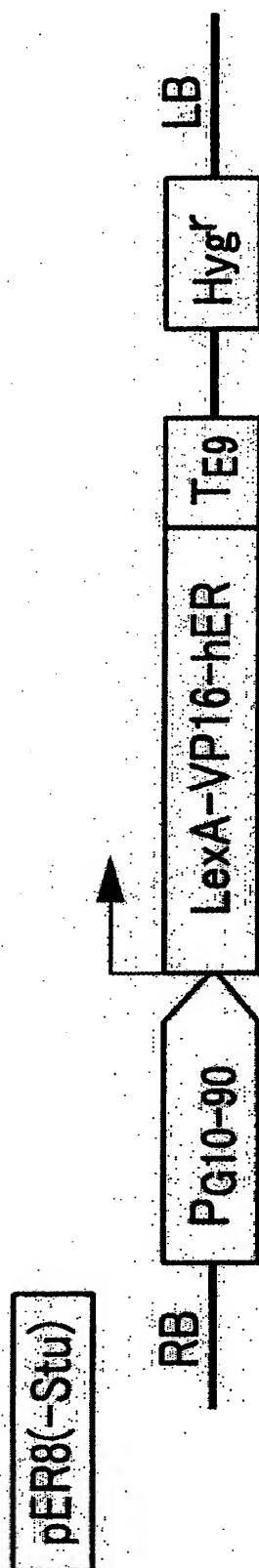
[図6(C)].



[図7]



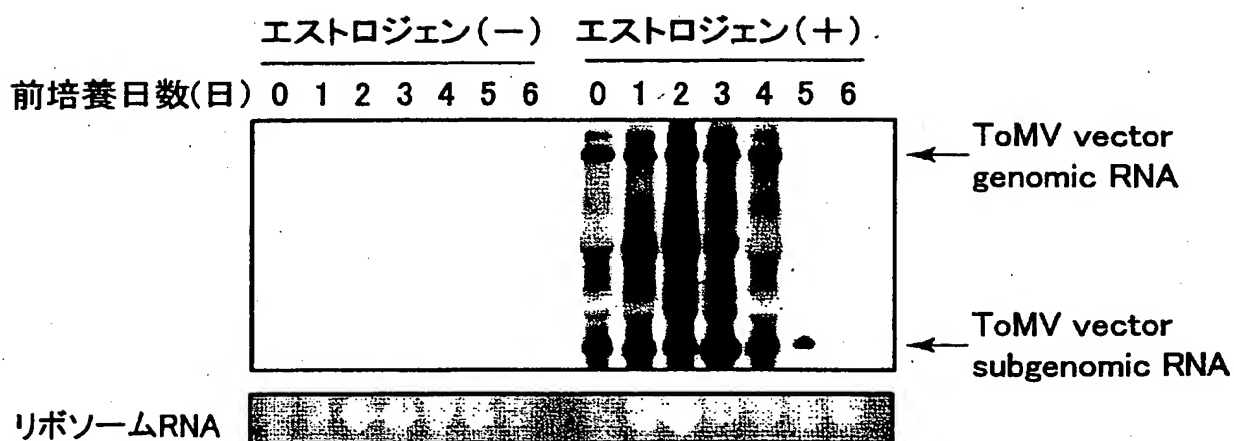
[図8(a)]



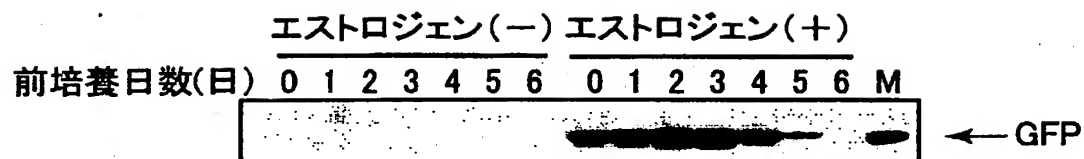
[図8(b)]



[図9(a)]



[図9(b)]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|--|
| <u>X</u> | Masayuki MORI, Masako FUKUOKA, "2. Shokubutsu Bunshi Iden Kenkyushitsu (1) Shokubutsu Virus o Mochiita Kokoritsu Tanpakushitsu Goseikei no Kaihatsu 1. Estrogen Seigyokei o Mochiita Yudo mRNA Zofukukei no Kochiku, 2. Tomato Mosaic Virus Vector no Shokubutsu ni Okeru Steroid Hormone ni yoru Yudo Hatsugen", Ishikawa-Ken Nogyo Tanki Daigaku Fuzoku Nogyo Shigen Kenkyusho Heisei 13 Nendo Nenpo (2002), No.10, pages 13 to 16 | 1-23, 46-48, 50-54, 57-64 24-45, 49, 55, 56 |
| A | Masayuki MORI, Masako FUKUOKA, "2. Shokubutsu Bunshi Iden Kenkyushitsu (1) Kokoritsu mRNA Yudo Zofukukei no Kochiku", Ishikawa-Ken Nogyo Tanki Daigaku Fuzoku Nogyo Shigen Kenkyusho Heisei 12 Nendo Nenpo (2001), No.9, pages 16 to 18 | 1-64 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 December, 2004 (14.12.04)

Date of mailing of the international search report
28 December, 2004 (28.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|--|
| <u>X</u> | Masayuki MORI, Masako FUKUOKA, "2. Shokubutsu Bunshi Iden Kenkyushitsu (1) Shokubutsu Virus o Mochiita Kokoritsu Tanpakushitsu Goseikei no Kaihatsu 1. Estrogen Seigyokei o Mochiita Yudo mRNA Zofukukei no Kochiku, 2. Tomato Mosaic Virus Vector no Shokubutsu ni Okeru Steroid Hormone ni yoru Yudo Hatsugen", Ishikawa-Ken Nogyo Tanki Daigaku Fuzoku Nogyo Shigen Kenkyu sho Heisei 13 Nendo Nenpo (2002), No.10, pages 13 to 16 | 1-23, 46-48, 50-54, 57-64 24-45, 49, 55, 56 |
| A | Masayuki MORI, Masako FUKUOKA, "2. Shokubutsu Bunshi Iden Kenkyushitsu (1) Kokoritsu mRNA Yudo Zofukukei no Kochiku", Ishikawa-Ken Nogyo Tanki Daigaku Fuzoku Nogyo Shigen Kenkyusho Heisei 12 Nendo Nenpo (2001), No.9, pages 16 to 18 | 1-64 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 December, 2004 (14.12.04)

Date of mailing of the international search report
28 December, 2004 (28.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014487

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | MORI, M. et al., Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants., Plant J.(2001), Vol.27, No.1, pages 79 to 86 | 1-64 |
| P,A | Masayuki MORI, Masako FUKUOKA, "2. Shokubutsu Bunshi Iden Kenkyushitsu (1) Tabacco Mosaic Virus no Zoshoku Kiko no Kaimei", Ishikawa-Ken Nogyo Tanki Daigaku Fuzoku Nogyo Shigen Kenkyu sho Heisei 14 Nendo Nenpo (26 December, 2003 (26.12.03)), No.11, pages 13 to 15 | 1-64 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014487

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | MORI, M. et al., Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants., Plant J.(2001), Vol.27, No.1, pages 79 to 86 | 1-64 |
| P,A | Masayuki MORI, Masako FUKUOKA, "2. Shokubutsu Bunshi Iden Kenkyushitsu (1) Tobacco Mosaic Virus no Zoshoku Kiko no Kaimei", Ishikawa-Ken Nogyo Tanki Daigaku Fuzoku Nogyo Shigen Kenkyu sho Heisei 14 Nendo Nenpo (26 December, 2003 (26.12.03)), No.11, pages 13 to 15 | 1-64 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014487

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 64 resides in "a gene having a plant virus gene carrying a suppressor for a virus resistant reaction containing a gene encoding a protein to be expressed and a promoter capable of inducing transcription bonded together". However, an expression vector (pTA7001-TOMV-erG3(SF3)) comprising a tomato mosaic virus vector having a promoter induced by a steroid hormone and a GFP gene transferred thereinto is described in document 1 (Ishikawa-Ken Nogyo Tanki Daigaku Fuzoku Nogyo Shigen Kenkyusho, Heisei 13 Nendo Nenpo (2002)), No.10, p.13-16). Thus, the above common matter falls within the category of prior art and, therefore, "a gene having (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014487

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 64 resides in "a gene having a plant virus gene carrying a suppressor for a virus resistant reaction containing a gene encoding a protein to be expressed and a promoter capable of inducing transcription bonded together". However, an expression vector (pTA7001-ToMV-erg3(SF3)) comprising a tomato mosaic virus vector having a promoter induced by a steroid hormone and a GFP gene transferred therein is described in document 1 (Ishikawa-Ken Nogyo Tanki Daigaku Fuzoku Nogyo Shigen Kenkyusho, Heisei 13 Nendo Nenpo (2002)), No.10, p.13-16). Thus, the above common matter falls within the category of prior art and, therefore, "a gene having (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014487

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

a plant virus gene carrying a suppressor for a virus resistant reaction containing a gene encoding a protein to be expressed and a promoter capable of inducing transcription bonded together" cannot be considered as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014487

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

a plant virus gene carrying a suppressor for a virus resistant reaction containing a gene encoding a protein to be expressed and a promoter capable of inducing transcription bonded together" cannot be considered as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N5/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|---|
| X A | 森正之, 福岡雅子, 2. 植物分子遺伝研究室 (1) 植物ウイルスを用いた高効率タンパク質合成系の開発 1. エストロジェン制御系を用いた誘導 mRNA 増幅系の構築, 2. トマトモザイクウイルスベクターの植物におけるステロイドホルモンによる誘導発現, 石川県農業短期大学付属農業資源研究所平成 13 年度年報 (2002), No. 10, p. 13-16 | 1-23, 46-48, 50-54, 57-64 24-45, 49, 55, 56 |
| A | 森正之, 福岡雅子, 2. 植物分子遺伝研究室 (1) 高効率 mRNA 誘導増幅系の構築, 石川県農業短期大学付属農業資源研究所平成 12 年度年報 (2001), No. 9, p. 16-18 | 1-64 |

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 12. 2004

国際調査報告の発送日

28.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 美葉子

4 N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | Mori M, et. al., Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants., Plant J. (2001), Vol. 27, No. 1, p. 79-86 | 1-64 |
| P A | 森正之, 福岡雅子, 2. 植物分子遺伝研究室(1) タバコモザイクウイルスの増殖機構の解明, 石川県農業短期大学付属農業資源研究所平成14年度年報(2003. 12. 26), No. 11, p. 13-15 | 1-64 |

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-64に共通の事項は「発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、転写誘導可能なプロモーターを連結する遺伝子」であるが、文献1 (石川県農業短期大学付属農業資源研究所平成13年度年報(2002), No. 10, p. 13-16) には、ステロイドホルモンで誘導されるプロモーターとGFP遺伝子を導入されたトマトモザイクウイルスベクターからなる発現ベクター pTA7001-ToMV-erG3(SF3)が記載されていることから、上記共通事項は先行技術の域をでるものではなく、「発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、転写誘導可能なプロモーターを連結する遺伝子」はPCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。